

A Mössbauer-spektroszkópia néhány növényélettani alkalmazása

Doktori értekezés

Kovács Krisztina

ELTE TTK Kémia Doktori Iskola

Iskolavezető: Dr. Inzelt György, a kémiai tudományok doktora

Elméleti és fizikai kémia, anyagszerkezet-kutatás program

Programvezető: Dr. Surján Péter, a fizikai tudományok doktora

Témavezető:

Dr. Vértés Attila, az MTA rendes tagja

Konzulensek:

Dr. Fodor Ferenc, PhD

Dr. Kuzmann Ernő, az MTA doktora

ELTE Kémiai Intézet

Budapest, 2009

Tartalomjegyzék

A dolgozatban előforduló mozaikszavak, rövidítések	5
1. Bevezetés	7
2. A vas(III)–indolecetsav rendszer vizsgálata	9
2.1. A kutatás háttere	9
2.1.1. Növényi növekedési hormonok	9
2.1.2. Az indolecetsav vas(III)-mal történő kölcsönhatásainak vizsgálata	11
2.1.3. Az indolecetsav oxidációjának vizsgálata	12
2.2. Kutatási célok	13
2.3. Vizsgálati módszerek	15
2.3.1. Mössbauer-spektroszkópia	15
2.3.2. Elemanalízis	21
2.3.3. Infravörös és Raman-spektroszkópia	21
2.3.4. Folyadék-röntgendiffrakciós analízis	22
2.3.5. Spektrofotometriás mérések	22
2.4. Kísérleti eredmények és értékelésük	23
2.4.1. A vizes oldatok vizsgálata Mössbauer-spektroszkópiával	23
2.4.2. A vas(III) és indolecetsav között lejátszódó reakciók vizsgálata szerves oldószerekben	26
2.4.3. A vizes oldatokban képződő szilárd vas–indolecetsav komplex szerkezetvizsgálata	31
2.4.4. A víz hatása a vas–indolecetsav komplex szerkezetére	39
2.4.5. A vas–indolecetsav között lezajló redukció lehetséges mechaniz- musa	40
3. A növényi vasszorbálás vizsgálata	45
3.1. A kutatás háttere	45
3.1.1. A növények ásványos táplálkozása	45
3.1.2. Vasszorbálási mechanizmusok és a vas transzlokációja a növényi szövetekben	49
3.1.3. Nehézfémek hatása a növények vasszorbálására	54
3.1.4. A növényi hormonok vasszorbálásra gyakorolt hatásai	55
3.1.5. A Mössbauer-spektroszkópia alkalmazása a növényi vasszorbálás vizsgálatában	56
3.2. Kutatási célok	60
3.3. Kísérleti eljárások	60

3.3.1.	Az uborka és búza növények nevelése	60
3.3.2.	Mössbauer-analízis	62
3.3.3.	A gyökér vas- és kadmiumtartalmának meghatározása	62
3.3.4.	A vas-kelát reduktáz aktivitás mérése	63
3.3.5.	Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok	63
3.4.	Kísérleti eredmények és értékelésük	64
3.4.1.	A növények neveléséhez felhasznált $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát oldatok vizsgálata	64
3.4.2.	Optimális vasellátás mellett nevelt uborka és búza növények gyö- kerének vizsgálata	66
3.4.3.	Vashiányos körülmények között nevelt uborka és búza növények gyökerének vizsgálata	71
3.4.4.	Kadmium hatása az uborka vASFelvételére	78
3.4.5.	Az indolecetsav búza gyökerekre gyakorolt hatásainak vizsgálata	82
4.	Eredményeim összefoglalása	85
5.	Köszönetnyilvánítás	87
6.	Függelék	89
6.1.	A Mössbauer-spektroszkópiás mérésekhez felhasznált minták összetétele	89
6.2.	A spektrofotometriás mérésekhez felhasznált minták összetétele	90
	Irodalomjegyzék	91
	Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények	97
	Summary	99
	Összefoglalás	101

A dolgozatban előforduló mozaikszavak, rövidítések

AFS	(<i>apparent free space</i>) látszólagos szabad hely
AHA	(<i>Arabidopsis H⁺-ATPase</i>) Arabidopsis H ⁺ -ATPáz
bipy	(<i>2,2'-bipyridil</i>) 2,2'-bipiridil
BPDS	(<i>bathophenanthroline disulphonate</i>) batofenantrolin-diszulfonát
Cit	citrát
DFS	(<i>Donnan free space</i>) Donnan szabad hely
DMA	(<i>2'-deoxymugineic acid</i>) 2'-deoxi-mugineinsav
dw	(<i>dry weight</i>) száraztömeg
EDTA	(<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>) etiléndiamin-tetraecetsav
ETG	elektromostér-gradiens
FAD	(<i>flavin adenine dinucleotide</i>) flavin-adenin-dinukleotid
FRO2	(<i>ferric reductase oxidase 2</i>) vas-kelát reduktáz
fw	(<i>fresh weight</i>) frisstömeg
IA	(<i>indol-3-acetate</i>) indol-3-acetát
IAA	(<i>indole-3-acetic acid</i>) indol-3-ecetsav
IBA	(<i>indole-3-butyric acid</i>) indol-3-butánsav
ICA	(<i>indole-3-carboxylic acid</i>) indol-3-karbonsav
ICP-MS	(<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>) induktív csatolású plazma tömegspektrometria
IPA	(<i>indole-3-propionic acid</i>) indol-3-propánsav
IR	(<i>infrared spectroscopy</i>) infravörös spektroszkópia
IRT1	(<i>iron-regulated transporter 1</i>) vas(II)-transzporter
MA	(<i>mugineic acid</i>) mugineinsav
MES	(<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>) 2-(N-morfolino)-etánszulfonsav
NA	(<i>nicotianamine</i>) nikociánamin
NADP	(<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>) nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NMR	(<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>) mágneses magrezonancia spektroszkópia
PAA	(<i>phenylacetic acid</i>) fenilecetsav
PCs	(<i>phytochelatins</i>) fitokelatinok
PS	(<i>phytosiderophore</i>) fitosziderofór
SLR	(<i>spin-lattice relaxation</i>) spin-rács relaxáció
SSR	(<i>spin-spin relaxation</i>) spin-spin relaxáció
TEM	(<i>transmission electronmicroscopy</i>) transzmissziós elektronmikroszkópia
TRP	(<i>tryptophane</i>) triptofán
YS1	(<i>yellow stripe 1</i>) vas(III)-fitosziderofór transzporter
WFS	(<i>water free space</i>) víz szabad hely

1.

Bevezetés

A Mössbauer-spektroszkópiát felfedezése után igen korán, már az 1960-as években alkalmazni kezdték kémiai és biológiai minták vizsgálatára. Jóllehet ma már a Mössbauer-spektroszkópia az analitika és a szerkezetkutatás széles körben használt módszerei közé sorolható, növénybiológiai alkalmazásai azonban – a módszer specifikussága miatt – igen korlátozottak.

Munkám során ^{57}Fe transzmissziós Mössbauer-spektroszkópiát alkalmaztam két növényélettani vonatkozású terület vizsgálatában. Az első témakör az egyik legfontosabb növekedésszabályzó növényi hormon, az indol-3-ecetsav oxidációs–redukciós tulajdonságainak és vas(III)-hoz történő koordinálódásának, a második témakör a növények vasháztartásának és a növényi vasszorbálás mechanizmusának vizsgálatát foglalja magában.

Munkámban – az ELTE Növényélettani Tanszékével szoros együttműködésben – megpróbáltam a nemzetközi szakirodalomban széleskörűen elfogadott növényfiziológiai módszereket a ^{57}Fe Mössbauer-spektroszkópia által nyújtott lehetőségekkel kombinálni. Ezáltal sikerült olyan új kísérleti eljárásokat találni, melyek segítségével nemcsak a növényben általában jelenlévő vasvegyületekről, hanem a vasszorbálás egyes lépései során a vas állapotában bekövetkező változásokról is részletes információkat kaphatunk. Ez a lehetőség a ^{57}Fe Mössbauer-spektroszkópia növények vizsgálatában betöltött szerepét kibővíti, és így számos – ezidáig nyitott – kérdés megválaszolásában segíthet.

2.

A vas(III)–indolecetsav rendszer vizsgálata

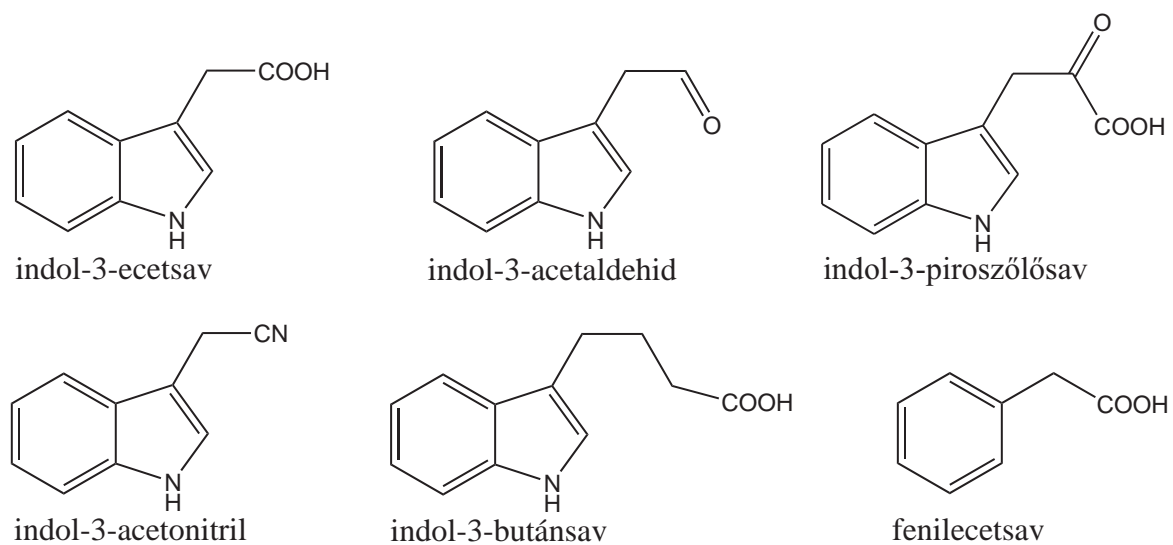
2.1. A kutatás háttere

2.1.1. Növényi növekedési hormonok

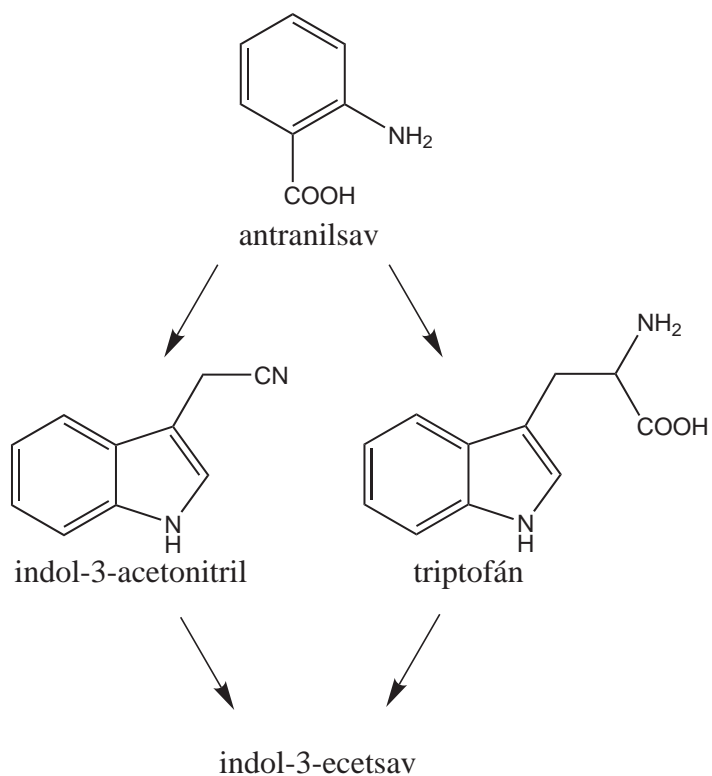
A növényi szervezetben lévő növekedésszabályozó anyagok felfedezése Charles Darwin nevéhez fűződik. Ő figyelte meg először a XIX. század végén, hogy a növények hajtáscsúcsában egy olyan jelhordozó anyag termelődik, amely a szárba transzportálódva annak megnyúlását eredményezi. A *hormon*¹ szó használata növények esetében Fitting nevéhez köthető [1–3]. A XX. század folyamán számos, növényfiziológiailag aktív vegyületet fedeztek fel, melyeket később szerkezetük vagy hatásaik alapján csoportosítottak. Az egyik legfontosabb vegyületcsoportot – melynek tagjai a növekedés szabályozásában vesznek részt – auxinoknak nevezték el (1. ábra). Ez utóbbiak legjelentősebb – mai ismereteink szerint a magasabbrendű növényekben egyedülálló – képviselőjének, az indol-3-ecetsavnak (angolul indole-3-acetic acid, IAA) növényi szöveteken belüli egyértelmű azonosítása 1942-re tehető [4]. Később részleteiben felderítették a növényi hormonok biokémiáját (szintézis, transzport, receptorok, lebontás) és a természetben megtalálható vegyületekhez hasonló hatású anyagokat is előállítottak (mesterséges növényi hormonok). Az IAA növényfiziológiai hatásait számos cikk és könyv részletesen tárgyalja [1, 5, 6], jelen fejezetben munkám szempontjából fontos jellemzőire és kémiai reakcióira térek ki részletesen.

Irodalmi adatok alapján az auxintermelés nemcsak a növényi szövetek sejtjein belül, endogén módon lehetséges, hanem a növények gyökérzetén (a rizoszférában) élő egyes mikroorganizmusok is képesek auxinok előállítására. Ennek részletes vizsgálatával foglalkozott többek között Patten [7] és Costacurta [8], akik részletesen összefoglalták az IAA bakteriális szintézisének lépéseit *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Agrobacterium* és *Rhizobium* fajokra, emellett a bakteriális IAA növényi szövetekre gyakorolt hatásait is tanulmányozták. Az említett szerzők munkájukban többféle szintézisutat mutatnak be, többek között az antranilsavból kiinduló IAA szintézist (2. ábra).

¹A *hormon* kifejezést általában olyan jelátvivő molekulára használjuk, mely információt hordoz az őt termelő sejt (szerv) állapotáról, és hatással van egy másik sejt (szerv) állapotára. Természetesen ez megköveteli az említett anyag adott szervezeten belüli transzportját is. Kezdetben csak állati szervezetben értelmezték, később terjesztették ki a növényekre [1].



1. ábra. Néhány, a növényi szervezetben előforduló auxin szerkezeti képlete.



2. ábra. Az IAA antranilsavból kiinduló bakteriális bioszintézisének néhány lépése.

2.1.2. Az indolecetsav vas(III)-mal történő kölcsönhatásainak vizsgálata

A talajbeli vas(III) komplexálására és redukálására képes anyagok ökológiai jelentősége kiemelkedő. Ezek rendkívül fontosak az élő szervezetek (mikroorganizmusok, növények) vasellátásában, mivel a vas jelentős része – még savas talajok esetében is – a vas(III)vegyületek hidrolízise és az így keletkező vas(III)-hidroxidok, vas(III)-oxidok alacsony oldhatósága miatt a sejtek számára nem felvehető [9]. A növények és baktériumok által termelt komplexképzők, az ún. sziderofórok azonban széles pH-tartományban stabil komplexet képeznek a vas(III)-mal, megnövelve a talajbeli ferrivegyületek oldhatóságát. A sejtek számára az így keletkező vas(III)-sziderofór komplex felvehetővé válik. Ezek a komplexképző anyagok közvetett módon – a vasfelvétel befolyásolása által – szerepet játszanak egyes szerves anyagok (aromás vegyületek, hosszú szénláncú zsírsavak) mikrobiális oxidációjában is, ugyanis az említett baktériumokban a vas(III) közreműködik ezekben a folyamatokban [10].

A fent vázolt kölcsönhatások tükrében a baktériumok által termelt anyagok vizsgálata tehát fontos lehet a talajbeli vas(III)vegyületek átalakítása (komplexképzés, redukció) szempontjából. Rioux és Jordan igazolták, hogy az IAA bioszintézisének egyik kiindulóvegyülete, az antranilsav, savas közegben képes a vas(III)-mal komplexet képezni, továbbá különböző vas(III)vegyületeket vas(II)vegyületekké redukálni [11, 12].

Vizes közegben oldott vas(III)sók és IAA elegye modellrendszerként szolgálhat a mikrobiális úton képződő IAA talajban bekövetkező átalakulásainak vizsgálatára. Ennek ellenére kevés irodalmi munka foglalkozik a vas(III) és az IAA közötti lehetséges komplexképződési vagy redoxireakciókkal. Néhány igen régi, az 1950-es évekből származó adaton [13, 14] kívül kevés utalás van az említett kölcsönhatásra, s ezek nagy része is csupán helyi közleményekben jelent meg [15, 16]. Ráadásul a kapott eredmények sok helyen hiányosak és egymásnak gyakran ellentmondóak.

A vas(III)–indolecetsav vizsgálatának terén figyelmet érdemel egy, a FeCl_3 –IAA elegyre vonatkozó munka [17], melyben a szerzők a Fe^{3+} -ionok IAA oxidálásában betöltött szerepét és a reakcióban képződött – általuk polimer anyagnak feltételezett – csapadék szerkezetét vizsgálták. Ez utóbbi analízise alapján a Fe :ligandum arányra tett javaslatuk 1:2 volt, de további, a szilárd anyag szerkezetére vonatkozó információt nem közöltek.

Részletesebb és pontosabb az A. A. Kamnev és munkatársai által készített tanulmány [18]. A kutatócsoportban Fe –IAA komplexet állítottak elő vizes közegben IAA- és $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ -oldat megfelelő mennyiségének elegyítésével, 4,5-es pH-érték mellett. A mintákban a ligandum hozzáadására kakaóbarna csapadék vált le, mely vízben kevésbé, de acetonban, etanolban jól oldódott. A csapadékba kerülő komplex szerkezetének felderítése érdekében elemanalízist, IR, NMR és Mössbauer-spektroszkópiás méréseket

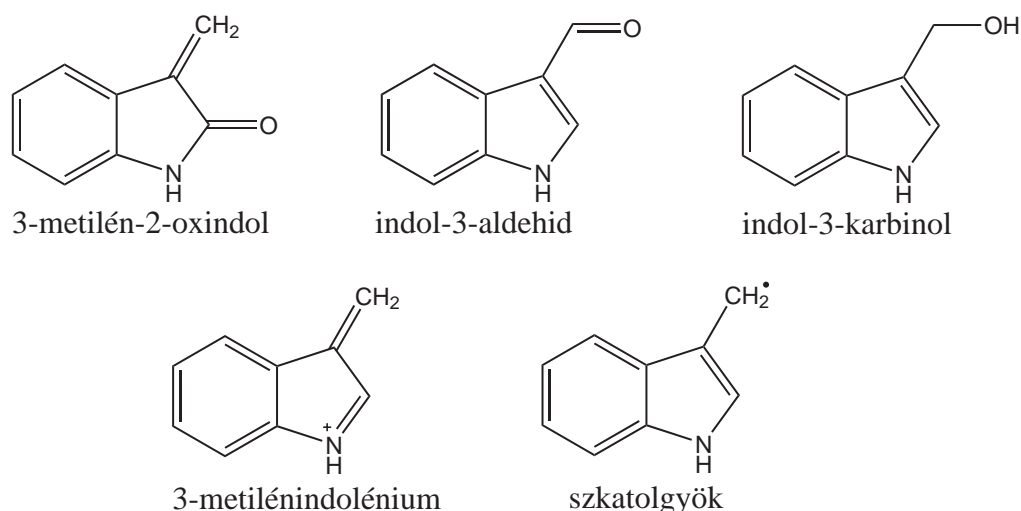
végeztek. A $\text{Fe}[(\text{C}_8\text{H}_6\text{N})\text{CH}_2\text{COO}]_3$ képletűnek adódó komplexet kelátszerkezetűnek találták, amelyben a központi Fe^{3+} -hoz az indolváz öttagú gyűrűrésztetének delokalizálódott elektronjai és az oldallánc karboxilcsoportjának egyik O-atomja kapcsolódik. A $\text{Fe}^{\text{III}}\text{--OOC}$ kötést kovalens jellegűnek azonosították. Mössbauer-spektroszkópia segítségével követték az oldatban az IAA redukzív hatására megjelenő Fe^{2+} mennyiségét. Az oldatminták beszárításával nyert szilárd maradékban azonban +2 oxidációs állapotú vasat nem tudtak kimutatni, tehát az összes redukálódott vas a levegőn visszaoxidálódott vas(III)-má, feltehetően különböző szerkezetű vas(III)-oxidokat képezve.

2.1.3. Az indolecetsav oxidációjának vizsgálata

A vas(III)–IAA rendszer a növényélettanban nemcsak a vas homeosztázisa, hanem az IAA sejten belüli lebontásának mechanizmusa szempontjából is lényeges, ugyanis az oxidatív degradációt végző enzimek aktív centrumában egy +3-as oxidációs állapotú vas található [19,20]. A vizes oldatban előállított vas(III)–IAA rendszer így modellként szolgálhat az enzimatis oxidáció folyamatának leírására is. Az említett oxidáz, illetve peroxidáz enzimek működésének számos részlete ismert, azonban az oxidáció pontos mechanizmusát máig sem sikerült teljesen feltérképezni.

Korai összefoglaló munkák szerint az enzimatis oxidáció során a képződő termékek aránya a kiindulási koncentrációktól erősen függ, és természetesen a pH is befolyásolja az oxidációs utakat. Fő termékként a 3-metilén-2-oxindolt azonosították [21] (3. ábra). Az említett referencia utal a vas(III) oxidációt katalizáló szerepére is, és a vas(III)–IAA rendszerben egy közvetlen egyelektronos átmenetet feltételez. Későbbi munkák számos részlettel egészítették ki a megfigyeléseket: azonosították az oxidációs termékek között az indol-3-aldehidet és az indol-3-karbinolt (3. ábra), kiemelték az oxigén szerepét, és fontos reakcióként rámutattak az IAA spontán vagy valamilyen fémion (Pb^{4+} , Co^{3+} , Ag^{2+}) által elősegített, oxidációt követő dekarboxileződési reakciójára [19, 20, 22]. A spontán dekarboxileződés az enzimatis oxidatív degradációban szintén fontos szerepet kaphat.

Mivel az enzimatis oxidáció rendkívül összetett és soklépcsős folyamat, más, egyszerűbb modellrendszereket is részletesen tanulmányoztak. Legjelentősebbek az elektrokémiai oxidációval foglalkozó tanulmányok, melyek többnyire savas közegre (pH 2–3) adnak részletes információkat. Egy 1993-as munka mintegy 17 oxidációs terméket mutatott ki az IAA oxidációja során, és javaslatot tett az oxidációs mechanizmusra is (4. ábra), melyet azonban részleteiben nem bizonyított [23]. A több ponton elágazó reakcióutak közül kiemelte az oxidatív dekarboxileződési lépést, melynek során az IAA-ból 3-metilénindolénium kation (3. ábra) képződött. Ez utóbbi köztitermék számos további reakcióban vett részt. Heminnel módosított, vas(III)-at tartalmazó elektród-



3. ábra. Az irodalomban szereplő néhány fő oxidált indolszármazék, illetve a dekarboxileződéssel képződő metilénindolénium kation és szkatolgyök szerkezeti képlete.

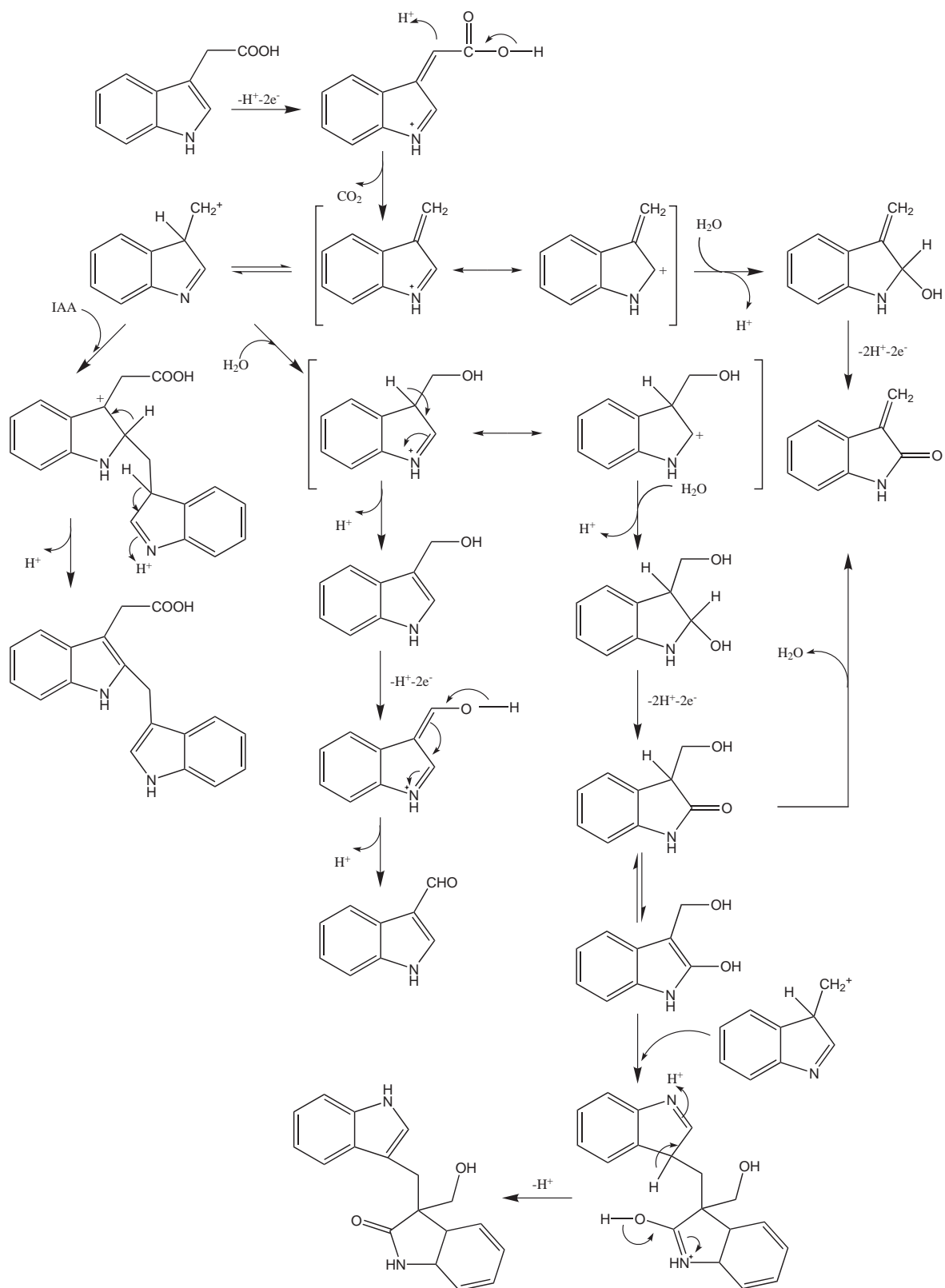
nak az IAA oxidációs folyamatára gyakorolt hatását vizsgálta egy későbbi, 2002-es munka [24]. A vékony rétegben az elektród felületére felvitt hemin elősegítette az IAA oxidációját. Az idézett munkában azonban az oxidáció reakciótermékeit nem analizálták.

Egy másik munkában [25,26] az IAA oxidációját radiolízissel tanulmányozták, melynek során adott energiájú sugárzással KBr vizes oldatában *in situ* előállított $\text{Br}_2^{\bullet-}$ gyökök segítségével oxidálták az IAA-at. A képződő termékeket elektronspin rezonancia spektroszkópiával és spektrofotometriával vizsgálták. Az IAA oxidációjára vonatkozó korábbi irodalmi adatok alátámasztása mellett az említett szerzők kimutatták, hogy az egyelektron veszteséssel képződő IAA gyök gyors dekarboxileződéssel szkatolgyökké (3. ábra) alakul, mely további reakciók kiindulási molekulája.

2.2. Kutatási célok

Munkám során az ezidáig keveset vizsgált Fe^{3+} -IAA rendszerrel foglalkoztam. FeCl_3 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ és IAA között lezajló reakciókat tanulmányoztam különböző kísérleti körülmények között. Emellett részletesen vizsgáltam a vizes közegben képződő szilárd Fe-IAA komplex szerkezetét, hogy kiegészítsem a korábbi publikációkban megjelent irodalmi adatokat. A kísérletek alapján a következő fő kérdésekre kerestem a választ:

1. Milyen reakciók mennek végbe az IAA és a Fe^{3+} között vizes közegben, savas kémhatás esetén?
2. Mi a Fe^{3+} és az IAA reakciója során vizes közegben csapadékként képződő szilárd komplex szerkezete?



4. ábra. Az IAA savas vizes közegben végzett elektrokémiai oxidációja során lejátszódó folyamatok néhány fő lépése [23] alapján.

2.3. Vizsgálati módszerek

Munkám során elsősorban ^{57}Fe transzmissziós Mössbauer-spektroszkópiát alkalmaztam a lefagyasztott Fe^{III} -IAA elegyek vizsgálatára, melynek eredményeit spektrofotometriás vizsgálatokkal egészítettem ki. A vizes közegben keletkező komplex szerkezetének vizsgálatához a ^{57}Fe Mössbauer-spektroszkópián kívül más szerkezetvizsgálati módszereket is alkalmaztam. Ezek az elemanalízis, az infravörös-spektroszkópia (IR), a Raman-spektroszkópia és a folyadék-röntgendiffrakciós analízis voltak.

2.3.1. Mössbauer-spektroszkópia

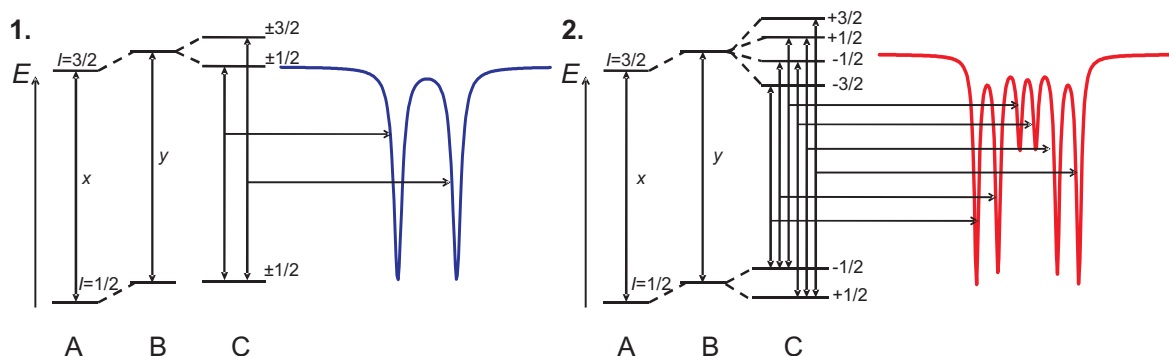
A Mössbauer-spektroszkópia Rudolf L. Mössbauer német fizikusról kapta a nevét. Alapja adott energiájú (általában néhányszor 10 keV-os) γ -fotonok atommagok által történő visszalökődésmentes rezonanciaabszorpciója (Mössbauer-effektus). Mivel az emitter és abszorbens atommagok gerjesztett állapotának élettartama nagy, a gerjesztett magenergia-nívók – és egyben a kibocsátott vagy elnyelt γ -fotonok – energiabi-zonytalansága rendkívül kicsi. Ennek köszönhetően a magnívóknak az atommag és a kémiai környezet kölcsönhatásai – az ún. hiperfinom kölcsönhatások – miatt bekövetkező megváltozása mérhetővé válik. Ezáltal az adott atommag helyén tapasztalható lokális elektromos és mágneses térről, illetve a szóban forgó atommag rezgési állapotáról kaphatunk egyedülálló információkat. A Mössbauer-spektroszkópia alapjait és felhasználását számos könyv és monográfia tárgyalja [27–32], dolgozatomban csak a módszer jelen munka szempontjából fontos jellemzőire térek ki.

A gyakorlatban a Mössbauer-spektroszkópiás mérések csak bizonyos elemek bizonyos izotópjai esetében valósíthatók meg. A vas izotópjai közül a kb. 2%-os gyakoriságú, stabil ^{57}Fe alkalmas a mérésre. Bár számos esetben természetes izotópösszetételű minták is jól mérhetők, kis koncentrációk esetén az abszorpció mértékének növelése érdekében szükség van izotópdúsított minták készítésére is.

Amint említettem, a kémiai környezet hatására az adott atommagok alap- és gerjesztett állapotának energiája megváltozik, illetve az eredetileg degenerált energianívók esetenként felhasadnak. A hiperfinom kölcsönhatások jellemzően $10^{-8} - 10^{-9}$ eV nagyságrendű változásokat okoznak a magenergia-szintekben, melyek a Mössbauer-spektrumban a rezonanciacsúcsok eltolódásában és felhasadásában jelennek meg. A spektrum felvételéhez a γ -energia ilyen nagyságrendű változtatása a forrás vagy a minta mozgásával, a Doppler-effektus révén oldható meg. A relatív energiákat ennek megfelelően sebességgént kifejezve, mm s^{-1} egységekben adják meg.

A Mössbauer-spektrumból közvetlenül nyerhető információk: a rezonanciavonalak megjelenési energiája, a csúcsok amplitúdója és félértékszélessége. Egy adott kémiai környezetben lévő atommag rezonanciavonalai együttesen alkotják az adott környezetre

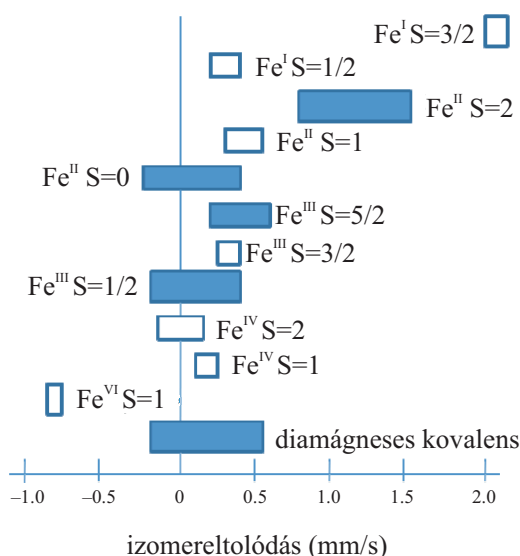
jellemző alspektrumot; többféle környezetet tartalmazó minta esetén a mért spektrum az egyes alspektrumok összege. Ez utóbbiak jellemző Mössbauer-paraméterei: az izomereltolódás (δ , egy felhasadást nem mutató spektrum esetén a csúcs maximumához tartozó sebesség), a kvadrupólusfelhasadás (Δ , a felhasadást mutató vonalak egymástól való távolsága sebesség egységben kifejezve) és a mágneses felhasadás (B , a vonalak egymástól való távolságából számítható mágneses indukció nagysága). Az említett Mössbauer-paramétereket szemlélteti az 5. ábra.



5. ábra. A hiperfinom kölcsönhatások hatása az atommagok energiaszintjeire. A felhasadások szerkezete az atommag alap, illetve gerjesztett állapotbeli magspinjétől (I) függ; az ábra a ^{57}Fe atommagra jellemző $1/2 \rightarrow 3/2$ átmenet esetére mutatja a vonalak eredetét és szerkezetét. A: az atommag energiaszintjei Coulomb-tér nélkül, B: az atommag energiaszintjei elektromos térben, C: az atommag energiaszintjeinek felhasadása (1.) kvadrupólus kölcsönhatás és (2.) mágneses kölcsönhatás következtében.

Az atommag és az azt körülvevő elektromos tér közötti elektrosztatikus kölcsönhatás okozza a kémiai izomereltolódást (δ_C) és a kvadrupólusfelhasadást (Δ). A kémiai izomereltolódás az atommag helyén mérhető elektronsűrűséggel arányos, így értékéből elsősorban a vizsgált atom oxidációs állapotára lehet következtetni. A rezonanciacsúcsok eltolódásához azonban az atommagok hőmozgásából adódó másodrendű Doppler-effektus is hozzájárul. Az izomereltolódás értéke (az 5. ábra jelölésével: $y_{\text{abszorbens}} - y_{\text{forrás}}$) a kémiai izomereltolódás és a fent említett hőmérsékletfüggő másodrendű Doppler-effektus összegeként kapható meg. Az izomereltolódást a gyakorlatban egy adott, jól definiált kémiai környezetben lévő atommaghoz képest relatív értéként tudjuk megadni. Jelen dolgozatban az összes izomereltolódás az $\alpha\text{-Fe}$ szobahőmérsékleten mért izomereltolódásához képest értendő. A különböző oxidációs állapotban lévő ^{57}Fe atomokra jellemző izomereltolódás-tartományokat szemlélteti a 6. ábra.

A kvadrupólusfelhasadás a magot körülvevő elektromos tér aszimmetriájának következménye, értéke a mag helyén észlelhető elektromostér-gradiens tenzor (**ETG**) függvénye. Ennek a térgradiensnek többféle eredete lehet. Származhat egyrészt az atommagot körülvevő nem gömbszimmetrikus pályákon lévő elektronoktól (pl. a Fe^{II} esetén a részlegesen betöltött $3d$ alhéjon elhelyezkedő 6 elektrontól), másrészt az atommag



6. ábra. A különböző oxidációs és spinállapotú vasvegyületek tipikus izomereltolódás-értékei szobahőmérsékleten, α -Fe-ra vonatkoztatva.

közvetlen környezetében (az első ligandumszférában) elhelyezkedő dipóloktól, illetve a szomszédos ionoktól. A kvadrupólusfelhasadás értéke alapján empirikus úton javaslatot tehetünk a mag körül kialakult első koordinációs szféra térszerkezetére és az atom spinállapotára.

A mágneses felhasadásból, mely a magnívók Zeemann-felhasadásából származik, a lokális mágneses rendezettségre és a mágneses relaxációra következtethetünk. A mágneses rendezettség kialakulásának hőmérséklete, illetve a mágneses felhasadás nagysága alapján esetenként azonosíthatók különböző vegyületek, pl. egyes vastartalmú ásványok.

Információt hordoznak továbbá a Mössbauer-spektrum vonalintenzitásai. Vékony abszorbens esetén az egy spektrumban fellépő különböző alspektrumok területaránya – jó közelítéssel – az egyes alspektrumokhoz tartozó, különböző kémiai környezetű atommagok egymáshoz viszonyított relatív koncentrációjával arányos.²

A Mössbauer-effektus létrejöttéhez – mint ismeretes – a γ -fotonok visszalökődés-mentes emissziója és abszorpciója szükséges. Ehhez az atomokat kristályrácsban kell rögzíteni, azaz a Mössbauer-spektroszkópia szilárd halmazállapotú anyagok vizsgálatára alkalmas. A Mössbauer-effektus feltételei azonban oldatok gyors lefagyasztásával kapott üvegszerű szilárd anyagban is fennállnak. Számos méréssel igazolták, hogy megfelelően nagy hűtési sebesség mellett (minimum 8–10 K/s) a fagyasztott minta megőrzi

²Pontosabban az arányosság az adott kémiai környezetű atommag relatív koncentrációja és Mössbauer-Lamb faktorának (azaz a visszalökődés-mentes rezonanciaabszorpció valószínűségének) szorzata között áll fenn.

az oldatban eredetileg fennálló koordinációs viszonyokat, oxidációs állapotot és a kialakult kémiai kötésviszonyokat. Az említett hűtési sebesség mellett, illetve azt túllépve a mérhető Mössbauer-paraméterek függetlenek a hűtési sebesség további megváltoztatásától. A lefagyasztott oldatok mérési technikájáról, és a kialakuló szerkezet vizsgálatáról számos publikáció és monográfia született, ezek közül kiemelném Vértess Attila munkásságát [30, 31].

A Mössbauer-spektroszkópia, mivel a vizsgált atommag által érzékelt lokális mágneses térről tud információt adni, hasznos eszköznek bizonyulhat a párosítatlan elektronokat tartalmazó, tehát paramágneses rendszerek vizsgálatában. A párosítatlan elektronoktól származó mágneses tér magspinnel való kölcsönhatása a magenergia-szintek Zeeman-felhasadását okozza. A spinállapot időben történő változása esetén paramágneses spinrelaxációról beszélünk. Ha az elektronrendszer spinállapota időben nem (vagy nagyon lassan) változik, tiszta mágneses felhasadást mutató spektrumot kapunk. Ha a spinrelaxáció gyors, azaz a mag által érzékelt mágneses tér iránya gyorsan változik, a spektrumból teljesen eltűnnek a mágneses szerkezetre utaló tulajdonságok. A két szélső eset között egy anomálishan kiszélesedett vonalat tartalmazó spektrumot (ún. relaxációs spektrumot) mérünk. A spektrum tulajdonságát a spinrelaxáció karakterisztikus idejének (τ_{SR}) és a magspin Larmor-precessziója karakterisztikus idejének (τ_{L}) viszonya határozza meg. Lassú a spinrelaxáció, ha $\tau_{\text{SR}} > \tau_{\text{L}}$, ilyenkor tehát Zeeman-felhasadást látunk (7 (a). ábra). A mágneses szerkezet eltűnése a $\tau_{\text{SR}} < \tau_{\text{L}}$ esetén áll fenn (7 (b). ábra). Ha a két karakterisztikus idő összemérhető, relaxációs spektrumot kapunk (7 (c). ábra).

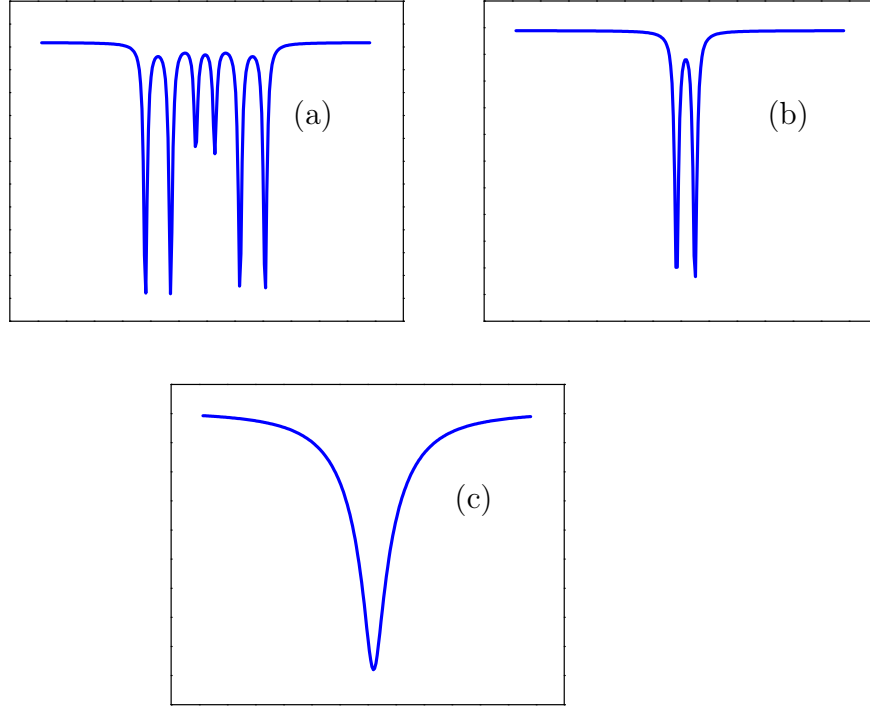
A paramágneses spinrelaxációt kétféle kölcsönhatás eredményezheti:

1. Egy szomszédos spinnel való kölcsönhatás, annak átfordítása (spin flip-flop) az ún. spin-spin relaxáció (SSR).
2. A paramágneses atom, illetve ion és az őt tartalmazó kristályrács rácsrezgéseinek fononjaival való kölcsönhatás, az ún. spin-rács relaxáció (SLR).

A SSR és a SLR idejét τ_{SSR} és τ_{SLR} -rel jelölve a relaxációs időt a következő kifejezés adja meg:

$$\tau_{\text{SR}} = \frac{1}{\frac{1}{\tau_{\text{SSR}}} + \frac{1}{\tau_{\text{SLR}}}}. \quad (1)$$

τ_{SSR} a paramágneses atomok, ionok egymástól való távolságától (pl. a Fe^{3+} -ionok koncentrációjától) és az adott atomokat, ionokat körülvevő ligandumoktól függ, értékét a hőmérséklet nem befolyásolja. τ_{SLR} -t, mely a rácsrezgések és a spinrendszer kölcsönhatásából adódik, a hőmérséklet és a pályamomentum határozzák meg. Pl. Fe^{3+} -ionok esetében, ahol a külső héj elektronkonfigurációja gömbszimmetrikus ($3d^5$, $^6\text{S}_{5/2}$ az alap-



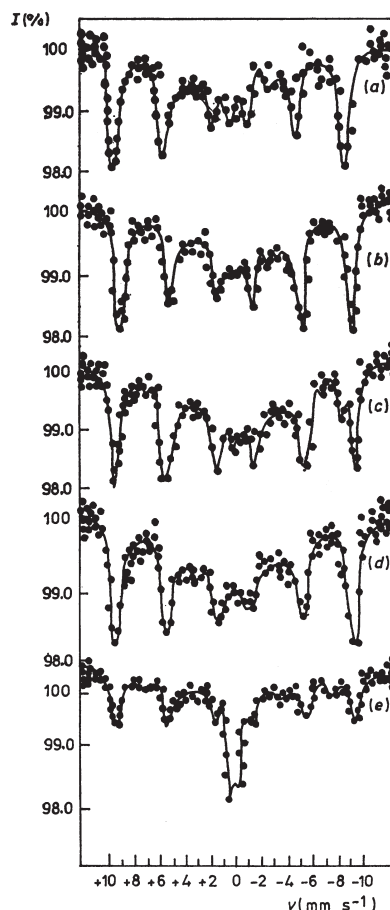
7. ábra. Különböző τ_{SR} és τ_{L} esetén kapható Mössbauer-spektrumok vonalalakja. (a) $\tau_{\text{SR}} > \tau_{\text{L}}$, (b) $\tau_{\text{SR}} < \tau_{\text{L}}$ és (c) $\tau_{\text{SR}} \approx \tau_{\text{L}}$.

állapot, $L = 0$), a SLR lassú. Meg kell említeni, hogy az ideálisan szimmetrikus környezet azonban a Fe^{3+} -at körülvevő ligandumokkal kialakított kötések is befolyásolják.

A fent bemutatott jelenség Fe^{3+} -oldatok vizsgálatában rendkívül hasznos, ugyanis a spektrumvonal alakjából egyértelműen következtethetünk az oldatban lévő részecskék egyes tulajdonságaira. Dimerek vagy oligomerek esetén ugyanis – híg oldatok³ ellenére is – az egyes Fe^{3+} -ionok megfelelő közelségbe kerülnek ahhoz, hogy a spin–spin relaxációs idő drasztikusan lecsökkenjen, így a mágneses, illetve relaxációs spektrum helyett dublett spektrumot kapunk. Mágneses felhasadást vagy relaxációt mutató spektrum azonban monomer Fe^{3+} -részecskékre utal. Ennek gyakorlati alkalmazását szemlélteti a különböző pH-jú $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ -oldatok Mössbauer-spektrumait bemutató 8. ábra. Az (e) spektrumban a mágneses szerkezet egy részének eltűnése a Fe^{3+} -ionok dimerizálódásával magyarázható. Jól látható a $0\text{--}1\text{ mm s}^{-1}$ sebességtartományban jelentkező dublett megjelenése, illetve a mágneses felhasadást jelző spektrumvonalak intenzitásának csökkenése.

A paramágneses rendszerekben tehát az atomoknak, ionoknak külső mágneses tér nélkül is van permanens mágneses momentuma, azonban az egyes mágneses momentu-

³Híg oldaton a gyakorlatban a $\sim 0,01\text{ M}$ -os Fe-koncentrációt értjük. Ennél egy nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációjú oldatok még izotópdúsítás esetén is nehezen vagy egyáltalán nem mérhetők.



8. ábra. 0,05 M-os $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ oldatok spektrumai 4,2 K-en: (a) 65%-os HNO_3 , (b) 30%-os HNO_3 , (c) 11,2%-os HNO_3 , (d) pH=1,0, (e) pH=2,0 [30] alapján.

mok egymáshoz képest nem mutatnak rendezettséget. Mágnesesen rendezett anyagok esetén a mágneses momentumok a köztük lévő kölcsönhatás miatt egymáshoz képest rendeződnek (pl. ferromágneses anyagokban a momentumok párhuzamosak). Ez a rendezettség az anyag kis egységeire, az ún. doménekre áll fenn. Minden doménben a mágnesezettség spontán telítődik, azonban a mágnesezettség iránya külső tér hiányában doménenként változik.

Amennyiben az anyag szemcsemérete kisebb, mint a mágneses domén mérete, szuperparamágneses anyagról beszélünk. A szuperparamágneses részecskékben a mágneses momentumok rendeződnek ugyan, de az eredő mágneses momentum iránya időben változhat (szuperparamágneses relaxáció). A relaxációs idő a részecskék méretétől és a hőmérséklettől függ.⁴ Amennyiben a relaxációs idő a magspin Larmor-precessziójának karakterisztikus idejéhez képest rövid, az anyag paramágnesesként, amennyiben hosszú, mágnesesen rendezett anyagként viselkedik. Adott szemcseméret esetén a mágneses

⁴A τ relaxációs időt a $\tau = f_0^{-1} \exp(2KV/kT)$ képlet adja meg, ahol V a részecskék térfogata, T a hőmérséklet, k a Boltzmann-állandó, K és f_0 konstansok.

rendezettség kialakulásának hőmérsékletét blokkolási hőmérsékletnek (*blocking temperature*) nevezzük. Az említett anyagok Mössbauer-spektroszkópiával jól vizsgálhatók, ugyanis a hőmérséklet függvényében felvett spektrumok alapján a mágneses felhasadást mutató alspektrum területarányának változásából a szuperparamágneses anyag részecskeméret-eloszlása megbecsülhető.

A Mössbauer-spektrumok kiértékelését a Mosswin3.0 szoftvercsomag felhasználásával végeztem [33]. Az „egyszerű” spektrumok (szingulett, dublett, szextett) esetén a vonalak alakját Lorentz-görbével illesztettem. A mágneses relaxációs spektrumok illesztéséhez a szoftverbe beépített ún. Blume–Tjon-modellt használtam [34]. A mágneses relaxációra vonatkozó Blume–Tjon-modell olyan Mössbauer-spektrumok leírására szolgál, ahol egy állandó elektromostér-gradiens mellett az atommagok véletlenszerűen változó mágneses teret érzékelnek. Tehát a mágneses tér vagy „felfelé”, vagy „lefelé” mutathat, irányát az **ETG** valamelyik főtengeleyével párhuzamosnak tekintjük.

Az összes oldatmintám Mössbauer-spektroszkópiás méréséhez a gyors lefagyasztás technikáját alkalmaztam, a Mössbauer-spektrumokat folyékony nitrogén hőmérsékleten rögzítettem. A minták pontos összetételét a Függelék tartalmazza.

2.3.2. Elemanalízis

Az elemanalízis során a vizsgálandó vegyületet alkotó egyes kémiai elemek aránya határozható meg. Az elemanalízist Medzihradszky-Schweiger Hedviggel (ELTE) együttműködésben, Vario EL III (Elementar Analysensystem GmbH) típusú készülékkel végeztük.

2.3.3. Infravörös és Raman-spektroszkópia

Az infravörös spektroszkópiában (IR) infravörös sugárzással a molekula rezgési átmeneit gerjesztjük. Az infravörös színképtartomány az elektromágneses spektrum látható és mikrohullámú része közé, hullámszámban kifejezve körülbelül a $12500\text{--}33\text{ cm}^{-1}$ tartományba esik. Az infravörös spektroszkópiát két fő célra alkalmazhatjuk. Egyrészt a molekulák egyes funkciós csoportjainak karakterisztikus rezgési frekvenciáiból szerkezeti információkat nyerhetünk, ugyanis bizonyos atomcsoportokhoz tartozó abszorpciós sávok a molekula távolabbi részeitől szinte függetlenül egy szűk frekvenciatartományon belül jelentkeznek. Másrészt az infravörös spektrum az adott molekula „ujjlenyomatának” tekinthető, és ezáltal minták azonosítására használhatjuk fel. Jelen munkában, az előbbinek megfelelően, karakterisztikus kötési és csoportfrekvenciákat használtunk fel szerkezetazonosításra.

A Raman-spektroszkópia alapja a fotonok molekuláról történő rugalmatlan szóródása. A Raman-effektus során a molekula állapota megváltozik, az új és a régi állapot

közötti energiakülönbséget a szóródó foton energiájának megváltozása kompenzálja. A rezgési Raman-spektroszkópiában – az IR spektroszkópiához hasonlóan – a molekula rezgési átmeneteit vizsgáljuk. Mivel azonban az IR és Raman jelek intenzitását más tényezők szabják meg, ezért a két spektroszkópia jól kiegészíti egymást.

Az IR és Raman méréseket Mink Jánossal (MTA KK) együttműködésben végeztük. A 4000–200 cm^{-1} tartománybeli méréseket Bio-Rad (Digilab) FTS-175 spektrométeren, a távoli infravörös tartományba (700–50 cm^{-1}) eső méréseket Bio-Rad (Digilab) FTS-40 spektrométeren kiviteleztek. A szilárd anyagot pasztilla formájában, CsI, illetve poli-etilén hígítással mértük. A szilárd anyagból deuteroacetone felhasználásával oldatmintákat is készítettünk, ezek IR spektrumait szintén felvettük. A Raman méréseket egyrészt oldatban, másrészt szilárd formában, a lézerindukálta bomlás elkerülésére ügyelve, Bio-Rad FT-Raman, illetve Renishaw System 1000 típusú spektrométerrel végeztük. Minden mérést szobahőmérsékleten, Fourier-transzformációs technikával kiviteleztek.

2.3.4. Folyadék-röntgendiffrakciós analízis

Az oldatok szerkezetéről különböző diffrakciós módszerekkel is nyerhetünk információt, melyek közé tartozik a röntgendiffrakciós kísérleti technika. A röntgendiffrakció a röntgenfotonok atomokon történő rugalmas szóródásán alapul. A folyadékok röntgendiffrakciós analízise esetén a folyadékok szerkezetére jellemző ún. szerkezeti és párkorrelációs függvények megfelelő járulékokra való bontása alapján az oldatban lévő atomok és molekulák egymáshoz viszonyított elrendeződésére következtethetünk.

A folyadék-röntgendiffrakciós analízist Megyes Tündével (MTA KK) együttműködésben végeztük. Az analízishez a vizsgálandó anyag 0,5 M-os metanolos⁵ oldatát használtuk fel. A méréseket szobahőmérsékleten, $\text{MoK}\alpha$ röntgensugárzással végeztük. Mintatartóként két, egymással párhuzamosan rögzített, 6,3 μm vastagságú mylar fólia szolgált. A szórási szög az 1,28–120°-os tartományt fedte le. A mérés egyéb technikai részleteinek megválasztása és az adatok feldolgozása korábbi munkák alapján történt [35–39].

2.3.5. Spektrofotometriás mérések

Az ultraibolya és látható színek tartományba eső fényabszorpció a molekulák elektron-szerkezetétől függ, az abszorpció során az elektronok alapállapotból magasabb energiájú állapotba kerülnek. A kereskedelembe kapható legtöbb készülékkel 200–800 nm hullámhossztartományban lehet dolgozni (közele ultraibolya és látható tartomány). A spektrofotometria segítségével szerkezetmeghatározást és kvantitatív analitikai méré-

⁵A metanol alkalmazását a számítások megkönnyítése indokolja.

seket végezhetünk. Szerkezetvizsgálat terén elsősorban színeképek összehasonlításával érhetünk el eredményeket. Az elektronspektrum általában ugyanis nem az anyagban található funkciós csoportokra, hanem az egész konjugált rendszerre jellemző. Legcélravezetőbb az irodalomban megtalálható azonos, vagy hasonló kötéseket tartalmazó vegyületek spektrumaival való összevetés. Kvantitatív analitikai célra a Lambert–Beer-törvény alapján alkalmazhatjuk, mely szerint az adott hullámhosszon mérhető abszorbancia egyenesen arányos a mért minta koncentrációjával, a mérésre használt küvetta rétegvastagságával, és a moláris abszorpciós koefficienssel. Ezáltal egy reakcióegyben egy adott termék képződését vagy fogyását is nyomon követhetjük, azaz kinetikai információkat is kaphatunk.

A spektrofotometriás méréseket Virender K. Sharma (Florida Institute of Technology) laboratóriumában végeztem. A mérés során SX.18 MV (Applied Photophysics, U. K.) típusú spektrofotométert használtam, mely – a megállított áramlás technikáját alkalmazva – nagy időfelbontással (0,05 s), 10 nm-es hullámhosszfelbontással, 400–600 nm-es hullámhossztartományban rögzítette a reagáló minták abszorpciós spektrumait. A megállított áramlásos reaktoron kívül „hagyományos” spektrofotométert is használtam (Shimadzu UV-2101PC). A spektrofotometriás mérésekhez felhasznált minták pontos összetételét a Függelék tartalmazza.

2.4. Kísérleti eredmények és értékelésük

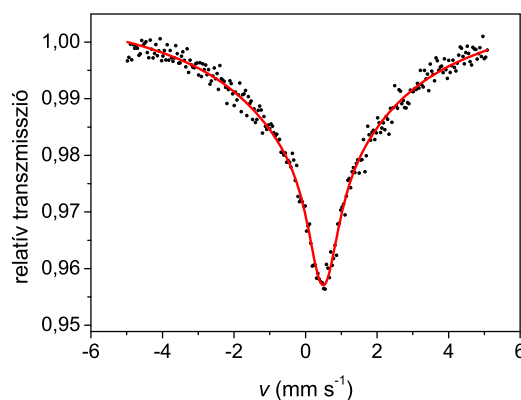
2.4.1. A vizes oldatok vizsgálata Mössbauer-spektroszkópiával

A Fe^{3+} –IAA reakcióinak Mössbauer-spektroszkópiás vizsgálatához 90 %-ban ^{57}Fe izotópdúsított fémvasból tömény salétromsav segítségével előállított 0,1 M-os $^{57}\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ oldatot használtam fel, melynek 80 K-en rögzített Mössbauer-spektruma a 9. ábrán látható. A spektrum egy széles vonallal illeszthető. Ez a híg Fe^{3+} -oldatokra jellemző lassú paramágneses spinrelaxáció következménye, ami monomer Fe^{3+} -ionok jelenlétét tükrözi. A kiindulási oldat tehát dimerizált Fe^{3+} -részecskéket és redukált állapotú Fe^{II} -t nem tartalmazott. Mindez összhangban áll a Fe^{3+} -oldatok vizsgálata során kapott korábbi irodalmi eredményekkel [30].

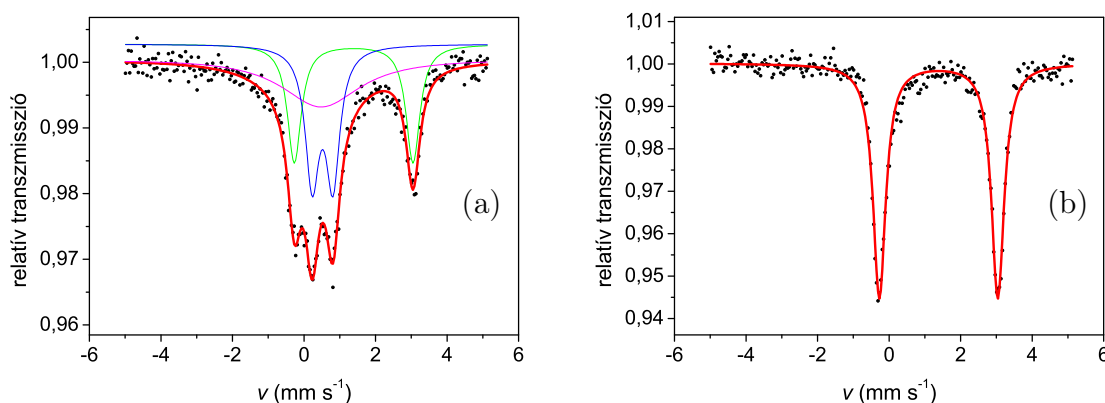
Az IAA-ból a kísérletekhez KOH segítségével készítettem oldatot,⁶ melyet 1:3 Fe:IAA aránynak megfelelően adtam a Fe^{3+} -oldathoz. Az elegyítés során csapadék képződött, melyet 15 perc, illetve 2 nap elteltével szűrővel eltávolítottam. A Mössbauer-mérésekhez az így kapott szűrleteket – melyek pH-ja kb. 2-nek adódott – használtam fel. A szűrlet Mössbauer-spektrumában a $^{57}\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ -hoz képest jelentős változást tapasztaltam, a relaxációs alspektrum mellett megjelent két, a kiértékelésben jól elkülöníthető

⁶Az IAA vízben kevésbé oldódik, ezért annak káliumsóját készítettem el.

dublett komponens is (10. ábra). A spektrumok illesztése során az 1. táblázatban felsorolt Mössbauer-paramétereket kaptam.



9. ábra. A 0,1 M-os $^{57}\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ oldat Mössbauer-spektruma 80 K hőmérsékleten (pH~1).



10. ábra. A Fe^{3+} -IAA oldatok Mössbauer-spektrumai 80 K hőmérsékleten, az elegyítést követően (a) 15 perc, (b) 2 nap elteltével, szűrés után fagyasztva.

A $0,52 \text{ mm s}^{-1}$ izomereltolódású, $0,58 \text{ mm s}^{-1}$ kvadrupólusfelhasadású dublett Mössbauer-paraméterei alapján egy Fe^{3+} -komponensként azonosítható. Ennek megjelenése a paramágneses spinrelaxáció $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ -oldathoz képest történő felgyorsulásával magyarázható. Ez – a kísérleti körülményeket figyelembe véve – a Fe^{3+} -ionok kölcsönhatására (spin–spin kölcsönhatás), azaz térbeli közelségükre utal. Mivel az oldatban a vas koncentrációja kb. 0,01 M volt, az ionok egymáshoz viszonyított közeli helyzete dimerek (esetleg nagyobb tagszámú oligomerek) kialakulásával lehet kapcsolatban. A dimerizáció vizes $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ -oldatokban pH~2–3 között az IAA távollétében is fellépő folyamat, melynek során a Fe^{3+} ionokhoz OH^- ionok koordinálódnak és az így létre-

minta	komponens	δ (mm s ⁻¹)	Δ (mm s ⁻¹)	Γ (mm s ⁻¹)	S (%)
Fe-IAA 15 perc állás pH~2	Fe ³⁺ -dimer	0,519(7)	0,58(1)	0,47(2)	13
	mágneses r.	0,42	—	—	76
	Fe ²⁺	1,389(7)	3,32(1)	0,47(2)	11
Fe-IAA 2 nap állás pH~2	Fe ³⁺ -dimer	—	—	—	—
	mágneses r.	—	—	—	—
	Fe ²⁺	1,385(2)	3,312(4)	0,428(7)	100

1. táblázat. A Fe³⁺-IAA rendszerekben 80 K hőmérsékleten mért Mössbauer-spektrumok felbontása során kapott paraméterek.

jövő részecskék dimerekké, oligomerekké rendeződnek. A feltételezett reakciólépéseket az (a)–(b) egyenletek mutatják [48]:



A Fe^{III}-IAA rendszerben a Fe³⁺-dimerre mért Mössbauer-paraméterek oktaéderes O₆ koordinációs szférát mutatnak egy nagy spinszámú Fe³⁺ körül. Ezek alapján nem dönthető el egyértelműen, pontosan milyen ligandumok, ionok vesznek részt a koordinációban, ugyanis az O²⁻, OH⁻, COO⁻ hasonló (álatában oktaéderes O₆) kémiai környezetet eredményez. Emellett valószínű, hogy az oldatban többféle – egymáshoz nagyon hasonló – koordináció egyszerre van jelen. Tehát ez a komponens egyaránt jelölhet egy IAA hatására kialakuló, dimer Fe-IAA komplexet, és egy pH-emelkedés hatására kialakuló Fe₂(OH)₂⁴⁺ komplexet is.⁷ A 15 perc reakcióidő után felvett spektrumon (10. ábra, (a) spektrum) a széles relaxációs spektrumkomponens megmaradása az eredeti Fe(NO₃)₃-oldatból származó monomer Fe³⁺-ionok jelenlétére utal.

Az 1,39 mm s⁻¹ izomereltolódással jellemezhető dublett egy +2 oxidációs állapotú vas megjelenését mutatja, ami az IAA hatására bekövetkező redukciót jelzi. Két nap reakcióidő elteltével már kizárólag a Fe²⁺-re jellemző dublett látható az oldatokban (10. ábra, (b) spektrum), ami a redukció teljes lezajlására utal, tehát mind az eredetileg jelen lévő monomer, mind a dimer Fe³⁺-komponensek átalakulnak. A keletkező Fe²⁺-re kapott paraméterek jó egyezést mutatnak a nagy spinszámú Fe²⁺ hexaakva-komplexére mért irodalmi adatokkal [30]. Ez arra utal, hogy a redukció során képződő +2 oxidációs állapotú vashoz sem a kiindulási IAA, sem annak oxidálódott termékei nem kapcsolódnak.

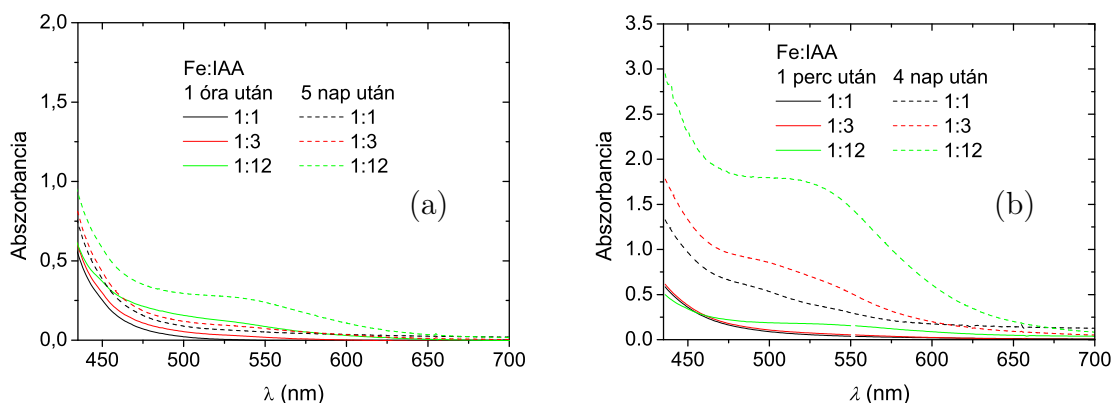
⁷Megjegyzendő, hogy az IAA ligandumokkal képződő Fe-IAA komplex vizes oldatban nagyrészt csapadékként van jelen, melyet a Mössbauer-mérés előtt szűréssel eltávolítottam. Kis mennyiségű Fe-IAA komplex oldatban maradása azonban nem zárható ki.

A vizes oldatok Mössbauer-spektroszkópiás vizsgálata alapján tehát savas közegben a Fe^{3+} és IAA között két reakció játszódik le. Az egyik reakció a monomer Fe^{3+} -ionok dimerizálódása és a Fe–IAA komplex kialakulása, mely a vizes közegben túlnyomórészt csapadékot képez. A másik reakció egy redoxifolyamat a Fe^{3+} és az IAA között, mely Fe^{2+} megjelenését eredményezi.

2.4.2. A vas(III) és indolecetsav között lejátszódó reakciók vizsgálata szerves oldószerekben

Mivel a szilárd Fe–IAA komplex szerves oldószerekben (etanolban, acetonban) jól oldódik, a Fe^{3+} –IAA között lejátszódó reakciók további vizsgálatát az említett oldószer segítségével végeztem. Ezekben a rendszerekben csapadék nem képződik, ezért a reakciók tanulmányozására a Mössbauer-spektroszkópián kívül spektrofotometriás méréseket is alkalmaztam. Ez utóbbi kísérleti technika – az oldószer és a vasvegyületek változtatásával – a vizes közegben tapasztalt komplexképződés és redukció idő- és oldószerfüggésének részletesebb vizsgálatát tette lehetővé. A spektrofotometriás mérések során természetes izotópösszetételű FeCl_3 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ és IAA oldatait elegyítettem abszolút etanol és etanol–víz oldószerekben.

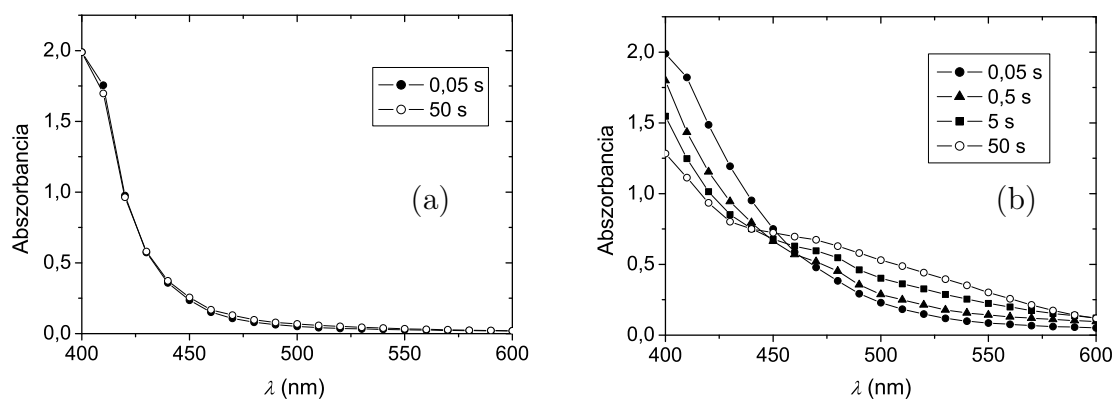
A FeCl_3 –IAA abszolút etanolban készített oldatainak látható hullámhossztartományban bekövetkező változásait a 11. ábra abszorpciós spektrumai mutatják. Az ábrák alapján megállapítható, hogy a különböző arányban összekevert FeCl_3 –IAA oldatok abszorpciója víz jelenléte nélkül az idő előrehaladtával nem változik meg számottevően (11. (a) ábra). Víz hozzáadása esetén azonban széles abszorpciós sáv alakul ki a 460–540 nm-es tartományban, mely idővel jelentős növekedést mutat (11. (b) ábra). Ezek a változások mind a Fe^{3+} –IAA közötti komplexképződést, mind az IAA Fe^{3+} hatására



11. ábra. A FeCl_3 –IAA abszolút etanolban készített elegyeinek látható tartományban felvett abszorpciós spektrumai (a) víz hozzáadása nélkül, (b) víz hozzáadása után.

bekövetkező oxidációját jelezhetik, azonban mindkét folyamat csak a víz hozzáadása után következik be.

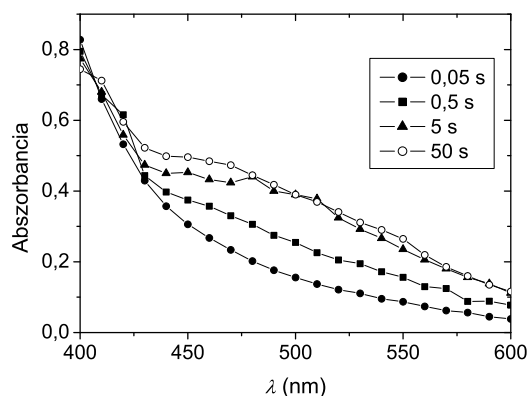
A továbbiakban a reakciók látható tartományba eső, rövidebb időskálájú (0,05 s) vizsgálatához a megállított áramlás technikáját alkalmaztam. Ennek során először FeCl_3 és IAA, majd $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ és IAA abszolút etanolos oldatait elegyítettem 1:3 Fe:IAA arányban. A 0,05 és 50 s között felvett spektrumokat 400–600 nm hullámhossztartományban a 12. ábra mutatja. Az (a) spektrumon látható, hogy 50 s alatt víz nélkül nem történik változás, míg a (b) spektrumban a már említett 460–540 nm-es tartományba eső abszorpciós sáv már 0,05 s alatt kialakul és az abszorbancia idővel jelentősen nő. Az előző méréssorozat eredményét figyelembe véve a $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ –IAA és a FeCl_3 –IAA elegyek közötti különbség a $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ -ban jelen lévő, viszonylag nagy mennyiségű kristályvíz jelenlétével magyarázható, mely elegendő a Fe^{3+} –IAA közötti reakciók elindításához.



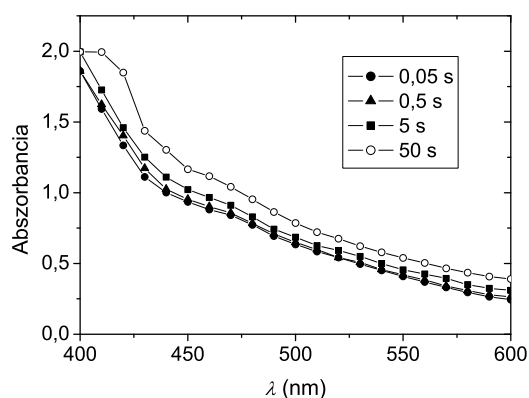
12. ábra. A Fe^{3+} és IAA oldatok elegyítése után különböző idők elteltével felvett abszorpciós spektrumok 1:3 Fe:IAA arány esetén: (a) FeCl_3 , abszolút etanol, (b) $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, abszolút etanol.

A víz hatásának további vizsgálata céljából 1:12 Fe:IAA arányú, abszolút etanolos FeCl_3 –IAA oldatot elegyítettem vízzel 1:1 térfogatarányban. Víz hatására a spektrumban 0,5 s elteltével jól láthatóan kialakul a 460–540 nm hullámhossztartományban a már említett széles abszorpciós sáv (13. ábra). A kapott eredmény ismét egyértelműen mutatja a víz szükségességét a Fe^{3+} és IAA között lejátszódó reakciókban.

Az előzőekkel azonos módon összeállított kísérleti elrendezésben szilárd Fe–IAA komplex abszolút etanolos oldatát is elegyítettem vízzel 1:1 térfogatarányban. A spektrofotometriás méréssel kapott eredményt a 14. ábra mutatja. A komplex spektrumán az előző etanolos rendszerektől eltérően keskenyebb, 450–500 nm-es hullámhossztartományban jelenik meg abszorpciós sáv, mely víz hozzáadására még 50 s elteltével sem mutat szignifikáns változást.



13. ábra. Az abszolút etanolban 1:12 arányban készített FeCl_3 -IAA oldat látható tartományban felvett abszorpciós spektruma vízzel 1:1 térfogatarányban történő elegyítése után, különböző idők elteltével.

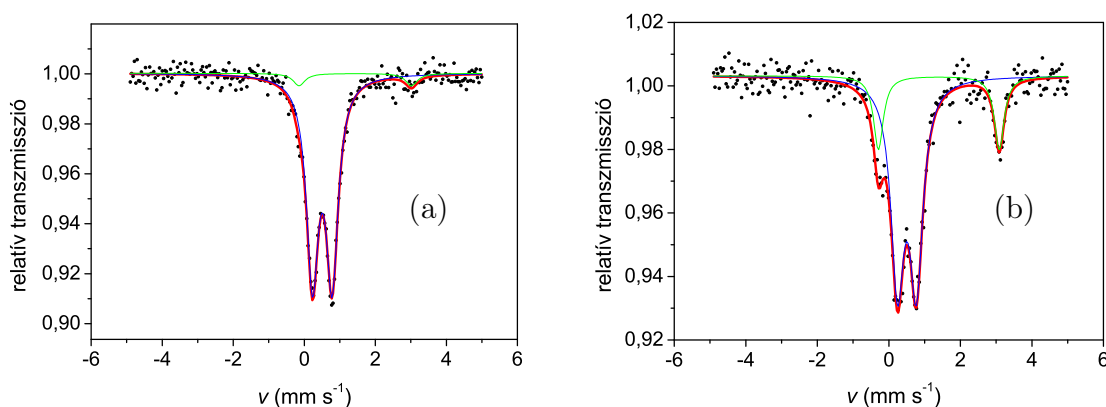


14. ábra. Abszolút etanolban oldott szilárd Fe -IAA komplex látható tartományban felvett spektrumai vízzel való elegyítés után, az eltelt idő függvényében.

A spektrofotometriás méréseket összefoglalva tehát megállapítható, hogy a Fe^{3+} -IAA közötti reakciók végbemeneteléhez víz szükséges, azonban a szilárd Fe -IAA komplex vízben történő kialakulása és szerves oldószerben való ismételt oldása után víz hozzáadása a komplex abszorpciós spektrumában már nem okoz további változást. Az említett spektrumok alapján az IAA Fe^{3+} -ionokkal történő komplexképződési és a Fe^{3+} hatására bekövetkező oxidációs reakciói nem különíthetők el egymástól, ezért az oxidációs folyamatok követése céljából a spektrofotometriás méréseket Mössbauer-spektroszkópiás mérésekkel egészítettem ki.

Ez utóbbi Mössbauer-spektroszkópiás mérésekhez 90 %-ban ^{57}Fe izotópdúsított fémvasból sósav segítségével $^{57}\text{FeCl}_3$ -oldatot, majd a kapott oldat beszárításával szilárd

$^{57}\text{FeCl}_3$ -ot⁸ állítottam elő. A $^{57}\text{FeCl}_3$ -ból és IAA-ból abszolút etanollal, etanol-víz eleggyel megfelelő töménységű oldatokat készítettem, az oldatok elegyítése során – a vízzel készített mintákhoz hasonlóan – a Fe:IAA arányt 1:3-nak választottam. A FeCl_3 és $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ reaktivitásának összehasonlításához a mérést természetes izotópösszetételű, kereskedelemben forgalmazott $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ felhasználásával is megismételtem.⁹ A gyors lefagyasztás technikájából adódóan a legrövidebb időintervallum az elegyítés után 50 s volt, ezért a gyorsan lejátszódó folyamatok vizsgálata Mössbauer-spektroszkópiával nem volt lehetséges, a reakció állapotáról 50 s és 20 perc elteltével kaptam információt. A $^{57}\text{FeCl}_3$ és IAA 1:3 arányú elegyéről etanol-víz oldószerben készült Mössbauer-spektrumokat a 15. ábra mutatja, a Mössbauer-paramétereket a 2. táblázat tartalmazza.



15. ábra. A $^{57}\text{FeCl}_3$ és IAA etanol-víz 1:1 térfogatarányú elegyében készített oldatainak Mössbauer-paraméterei 1:3 Fe:IAA arány mellett (a) 50 s és (b) 20 perc elteltével lefagyasztva.

A spektrumokon jól látható két dublett komponens megjelenése, melyek Mössbauer-paramétereik alapján egy Fe^{3+} -dimer és egy hexaakva- Fe^{2+} -komponensként azonosíthatók. A dimer Fe^{3+} -komponens képződése mellett tehát a Fe^{3+} redukciója már 50 s-on belül látható (6 %) és a Fe^{2+} mennyisége 20 perc után 21 %-ra nő. A dimer szerkezetű Fe^{3+} -komponensek és a Fe^{2+} jelenléte a vizes oldatokra kapott eredmények (2.4.1. fejezet) alapján nem meglepő. A monomer komponens azonban már 50 s elteltével is hiányzik az etanolos oldatokból, ami az etanolos oldatokban a dimerizálódási reakció vizes közeghez képest történő gyorsabb végbemenetelét mutatja.

⁸Az így nyert sóra továbbiakban vízmentes $^{57}\text{FeCl}_3$ -ként hivatkozom, jóllehet valóban vízmentes FeCl_3 -ot vizes oldatból nem lehet előállítani. Ehhez fémvas és klórgáz reakciója szükséges, és a további felhasználás is teljesen vízmentes atmoszférát igényelne. Továbbá érdemes megemlíteni, hogy vízmentes $^{57}\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ előállítása szintén nem volt lehetséges.

⁹A természetes izotópösszetételű sóra azért volt szükség, mert a $^{57}\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ oldatból történő előállítása nehézségekbe ütközött. Ez utóbbi esetben természetesen a végső Fe^{3+} -koncentráció a Mössbauer-mérések kivitelezhetősége miatt magasabb volt, mint az izotópdúsított mintákban.

minta	komponens	δ (mm s ⁻¹)	Δ (mm s ⁻¹)	Γ (mm s ⁻¹)	$S(\%)$
⁵⁷ FeCl ₃ +IAA 50 s után	Fe ³⁺ -dimer	0,508(3)	0,556(5)	0,405(7)	94
	Fe ²⁺	1,440(3)	3,160(6)	0,405(7)	6
⁵⁷ FeCl ₃ +IAA 20 perc után	Fe ³⁺ -dimer	0,506(5)	0,528(7)	0,44(1)	79
	Fe ²⁺	1,400(1)	3,380(2)	0,33(3)	21

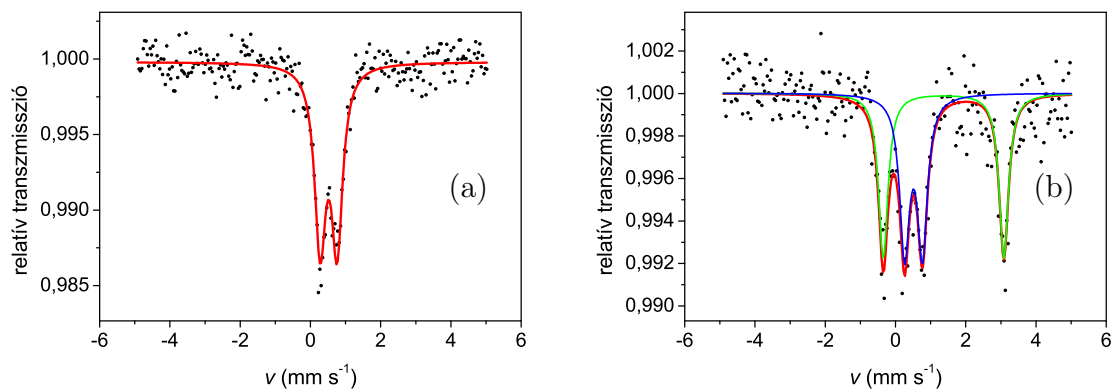
2. táblázat. A ⁵⁷FeCl₃ és IAA etanol-víz 1:1 térfogatarányú elegyében készített oldatainak Mössbauer-paraméterei 1:3 Fe:IAA arány mellett, 50 s és 20 perc elteltével fagyasztva.

A fent bemutatott FeCl₃-IAA rendszerhez hasonló eredményt kapunk a Fe(NO₃)₃·9H₂O és IAA abszolút etanolban kivitelezett reakciója esetén is (16. ábra, 3. táblázat), azonban víz hozzáadása nélkül – a Mössbauer-spektrum alapján, mely +2 oxidációs állapotú vasat nem mutat – a Fe(NO₃)₃·9H₂O-ban lévő kristályvíz-tartalom a redoxireakció elindításához önmagában nem tűnik elegendőnek. A reakcióelegy víztartalmát 1:1 víz:etanol térfogatarányig növelve 20 perc elteltével jelentős mértékű (50%) Fe²⁺ megjelenését tapasztaltam (16. (b) ábra, 3. táblázat), ami jelzi, hogy elegendő víz jelenlétében a vas redukciója a Fe(NO₃)₃·9H₂O-IAA esetén a gyorsabb, mint a ⁵⁷FeCl₃-IAA esetén.

A Mössbauer-spektroszkópiával kapott eredményeket a spektrofotometriás mérésekkel összevetve megállapítható, hogy a Fe³⁺-IAA között víz hatására végbemenő reakciók közül a Fe³⁺-ionok dimerizációja gyorsabban játszódik le, mint a Fe³⁺ redukciója. A spektrofotometriás mérésekben 460–540 nm között tapasztalt abszorpciós sávok mind a dimer Fe-IAA komplextől, mind az IAA oxidációjából keletkező termékektől és azok esetleges Fe-komplexeitől származhatnak. Mivel a szilárd Fe-IAA etanolos oldatának abszorpciója 450–500 nm között jelentős (14. ábra), az IAA említett oxidált termékei főként az 500 nm feletti abszorpciós sávért lehetnek felelősek (11. (b) ábra).

minta	komponens	δ (mm s ⁻¹)	Δ (mm s ⁻¹)	Γ (mm s ⁻¹)	$S(\%)$
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O+IAA abszolút etanol	Fe ³⁺ -dimer	0,518(7)	0,480(1)	0,38(2)	100
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O+IAA etanol-víz	Fe ³⁺ -dimer	0,510(1)	0,510(2)	0,34(2)	50
	Fe ²⁺	1,483(8)	3,430(2)	0,32(3)	50

3. táblázat. A Fe(NO₃)₃·9H₂O és IAA etanol-víz elegyben készített oldatainak Mössbauer-paraméterei 1:3 Fe:IAA arány mellett, 20 perc elteltével fagyasztva.



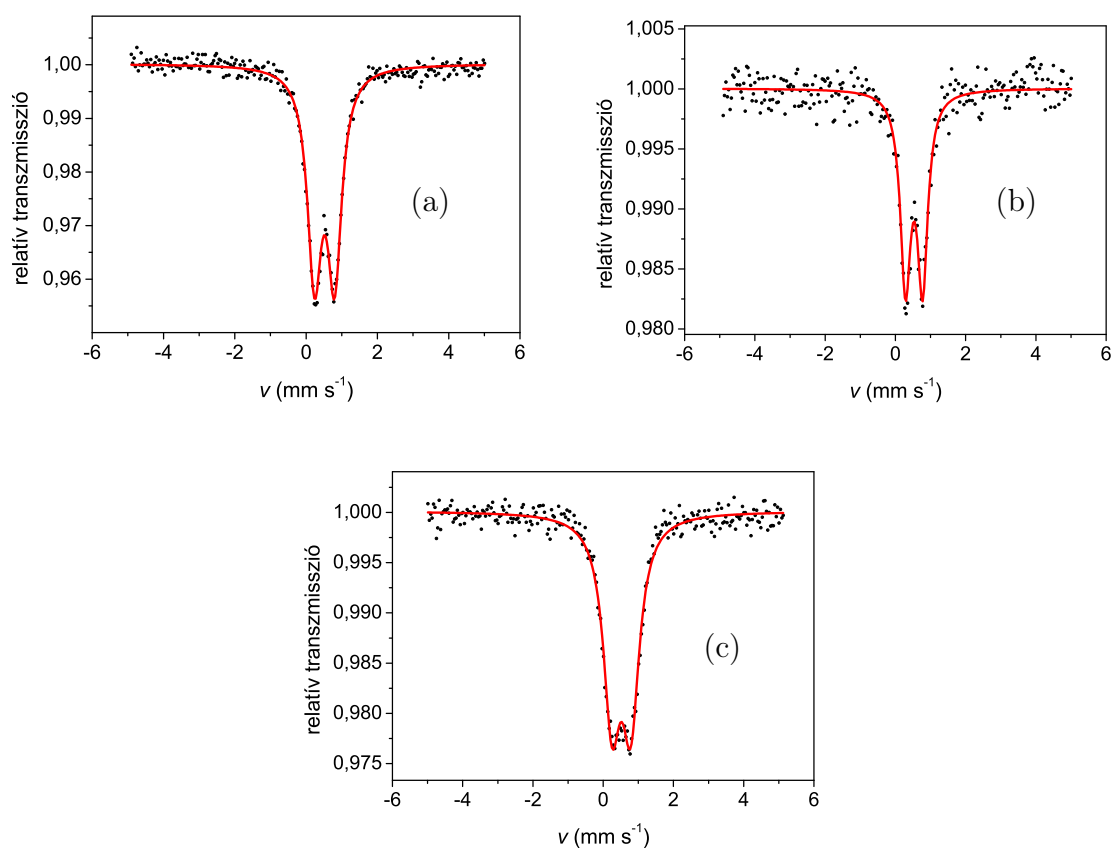
16. ábra. A $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ és IAA összekeverésével kapott minták Mössbauer-spektrumai 20 perc elteltével fagyasztva (a) abszolút etanolban és (b) etanol–víz 1:1 térfogatarányú elegyében. A Fe:IAA arány mindkét esetben 1:3 volt.

2.4.3. A vizes oldatokban képződő szilárd vas–indolecetsav komplex szerkezetvizsgálata

A szilárd anyag Mössbauer-spektroszkópiás méréséhez a vizes $^{57}\text{Fe}^{3+}$ –IAA elegy szűréséből nyert csapadékot használtam. Az elemanalízishez, IR, Raman szerkezetvizsgálatokhoz nagyobb mennyiségű anyagra volt szükségem, ezért ezeket a mintákat természetes izotópösszetételű $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ -oldat felhasználásával állítottam elő.

A szilárd Fe–IAA komplex és annak acetonban, etanolban készített oldatainak Mössbauer-spektrumai a 17. ábrán láthatók. A spektrumok felbontása során kapott Mössbauer-paraméterek (4. táblázat) egy dimer szerkezetű Fe^{3+} -komponens jelenlétét tükrözik. A szilárd anyag Mössbauer-paraméterei a szerves oldószerekben történő oldás hatására nem változnak meg számottevően.

A továbbiakban elvégeztük a szilárd anyag elemanalízisét. A Mössbauer-mérések eredményei szerint dimer szerkezetű komplex képződését feltételeztem, melyben a Fe^{3+} -ionok – a vizes Fe^{3+} -oldatokhoz hasonlóan – $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$ módon kapcsolódnak egymáshoz [40]. Ezek alapján egy $[(\text{IA})_2\text{Fe}(\text{OH})_2\text{Fe}(\text{IA})_2]$ összegképlettel (ahol IA = indol-3-acetát ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{NO}_2^-$)) jellemezhető molekulát kapunk, a számolt és mért elemi összetétel értékeit az 5. táblázatban foglaltam össze. A táblázat alapján a mért adatok a feltételezett szerkezettel jó egyezést mutatnak, a C relatív mennyiségének viszonylag nagy eltérése más, szintén dimer Fe-részecskék jelenlétéből adódhat (pl. $[\text{Fe}_2(\text{H}_2\text{O})_8(\text{OH})_2]^{4+}$), melyek képződése pH~2 körül vizes oldatban kedvezményezett. Ezenkívül az indol-3-ecetsav oxidációja során keletkező oxindol-származékok is kapcsolódhatnak a preparáció során kapott szilárd anyaghoz. Az említett szennyezések mennyisége azonban nem lehet számottevő, ugyanis a Mössbauer-spektrumok mind a szilárd komplexre, mind az etanolos, acetonos oldás során kapott komplexekre főként egyféle Fe^{3+} környezetet



17. ábra. (a) A szilárd Fe-IAA komplex és annak (b) abszolút etanol, (c) aceton oldószerekben készített oldatainak Mössbauer-spektrumai 20 perc elteltével fagyasztva.

minta	komponens	δ (mm s ⁻¹)	Δ (mm s ⁻¹)	Γ (mm s ⁻¹)	$S(\%)$
Fe-IAA szilárd	Fe ³⁺ -IAA	0,517(2)	0,564(4)	0,489(7)	100
Fe-IAA abszolút etanol	Fe ³⁺ -IAA dimer	0,531(5)	0,487(9)	0,36(1)	100
Fe-IAA aceton	Fe ³⁺ -IAA dimer	0,517(4)	0,538(7)	0,60(1)	100

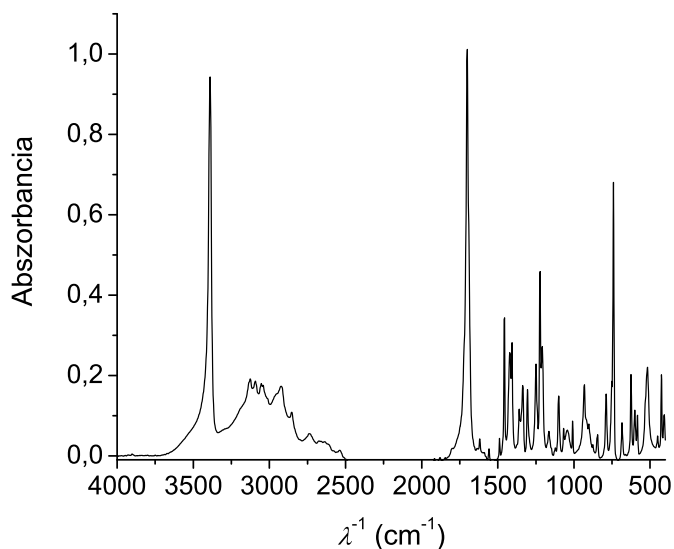
4. táblázat. A szilárd Fe-IAA komplex és a Fe-IAA komplex abszolút etanol és aceton oldószerekben készített oldatainak Mössbauer-paraméterei.

	C	H	N	Fe
feltételezett szerkezet	57,02	4,08	6,65	13,26
mért értékek	54,44	4,10	6,38	13,07

5. táblázat. A Fe-IAA komplexre számolt és mért elemanalízis eredményei. Az értékek tömegszázalékos összetételt jelentenek.

mutatnak (4. táblázat), és a szilárd anyagok szerves oldószerekben maradék nélkül oldódnak. (Megjegyzendő azonban, hogy a Mössbauer-paraméterek közül a viszonylag nagy vonalszélesség származhat ezen anyagok jelenlététől.)

A szabad ligandum IR- és Raman-spektrumai alapján jól elkülöníthetők az NH és COOH csoportokra jellemző karakterisztikus rezgési frekvenciák (18. ábra, 6. táblázat). A 3000 cm^{-1} -nél található széles abszorpciós maximum a karbonsavak asszociált COOH csoportjainak $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$ vegyértékrezgéséből származik. Erre a sávra ráakódnak a C-H vegyértékrezgési frekvenciák is. Az 1700 cm^{-1} -nél található erős és intenzív sáv a C=O csoportra jellemző vegyértékrezgés, ami a COOH csoportot egyértelműen jelzi. Az 1500 cm^{-1} alatt megjelenő gyenge sávok az O-H, C-O vegyértékrezgések kombinációihoz tartoznak.

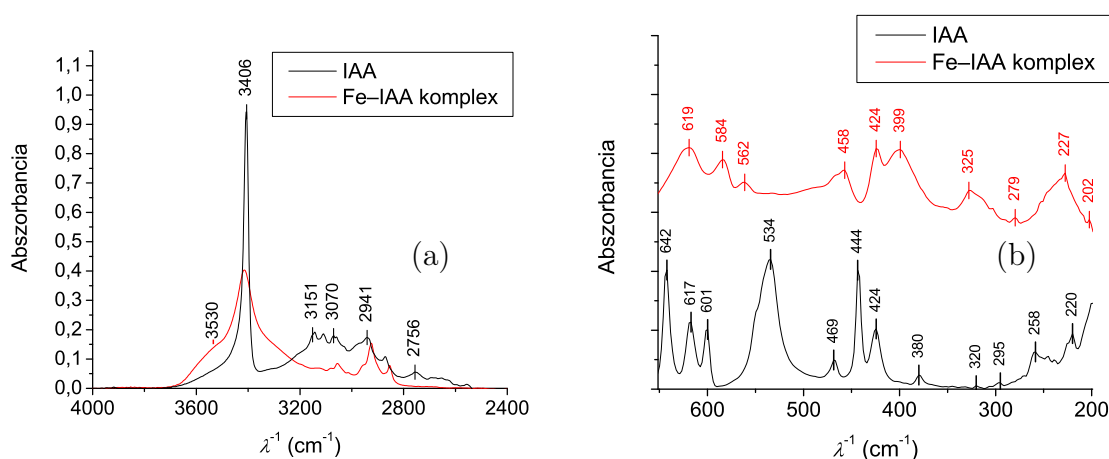


18. ábra. A szilárd indol-3-ecetsav IR spektruma.

A komplexképződés hatására a szabad IAA-hoz képest megváltozik a rezgési színkép. A komplex jellemző abszorpcióit a 7. táblázatban foglaltam össze, a közeli és távoli infravörös tartományok IR spektrumait a 19. (a, b) ábrák mutatják. Az IAA NH vegyértékrezgés hullámszáma (3406 cm^{-1}) a komplexképződés hatására láthatóan nem változik meg. Az abszorpciós sáv szélesedése kismértékű szerkezetbeli perturbációra utal, valószínűleg a kristályos IAA-ban lévő H-kötések megváltozásával magyarázható. Ez utóbbi hatás mind a COOH, mind az NH csoportokhoz tartozó rezgési frekvenciákat befolyásolja. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy az indolgyűrű N-atomja – melynek nemkötő elektronpárja az aromás rendszer része – nem koordinálódik a Fe^{3+} -hoz (nem deprotonálódik a komplexképződés során). A 3550 cm^{-1} hullámszámnál megjelenő kö-

Abszorpciós sávok (cm^{-1})		Asszignáció
IR	Raman	
3406 ie	3387 igy	NH vegyértékrezgés
2736 gy, sz	—	} OH deformációk, C–O vegyértékrezgések kombinációi, felhangjai
2636 igy, sz	—	
2539 gy, sz	—	
1700 ie	—	C=O vegyértékrezgés
1305 k	1306 igy	C–O vegyértékrezgés
1208 k	—	OH síkbeli deformációs rezgés
—	904 gy	OH síkra merőleges deformációs rezgés
684 gy	674 gy	C=O síkbeli deformációs rezgés
601 gy	—	COO bólogató rezgés
518 gy, sz	—	COO kaszáló rezgés

6. táblázat. Az indol-3-ecetsav NH és COOH csoportjainak rezgési frekvenciái. A táblázatban az adott hullámszámnál jelentkező sávok intenzitását a következő rövidítésekkel adtam meg: ie–igen erős, e–erős, k–közepes, gy–gyenge, igy–igen gyenge, sz–széles.



19. ábra. Az IAA és a Fe-IAA komplex IR spektrumai (a) közeli és (b) távoli infravörös tartományban.

zepes intenzitású sáv (az NH vegyértékrezgési csúcsán vállként jelentkezik) a Fe^{3+} -hoz kapcsolódó OH csoportok vegyértékrezgéseként azonosítható.

A karboxilcsoportra jellemző sávok ($3000, 2600, 1700 \text{ cm}^{-1}$) a komplex IR spektrumából hiányoznak, helyettük $1590, 1531, 1430$ és 562 cm^{-1} hullámszámoknál találhatók abszorpciós sávok (7. táblázat). Ez utóbbiak a kétfogú karboxilát csoportok jelenlétét bizonyítják. Az újonnan megjelenő CC és CH_2 csoportokhoz tartozó rezgések az IAA oldalláncában a vashoz történő koordináció hatására bekövetkező konformációs változásokat jelzik.

Az Fe_2OH molekularészlethez tartozó rezgések azonosításához az IAA-val analóg szerkezetű indol-3-butánsav (IBA) Fe^{3+} -komplexére elvégzett ún. deuterálós mérés

Abszorpciós sávok (cm^{-1})		Asszignáció
IR	Raman	
3530 k, sz	—	OH vegyértékrezgés
3406 e	—	NH vegyértékrezgés
1590 ie	1597 igy	} COO aszimmetrikus vegyértékrezgés
1531 k, váll	—	
1430 ie	1426 ie	
1282 gy, k	1280 gy, sz	} CH_2 bólogató rezgés
—	1223 k	
1150 gy	1168 gy	CH_2 torziós rezgés
—	1062 gy	} FeOH deformációs rezgés
—	1027 gy	
945 gy, sz	948 gy	} CC vegyértékrezgés
—	889 gy	
—	815 gy	} CH_2 kaszáló rezgés
708 gy	713 gy	
562 gy	546 gy	COO torziós rezgés
458 k	460 k	Fe–OH vegyértékrezgés
399 e	—	} Fe–O vegyértékrezgés
325 k	—	
316 k, váll	314 gy	
—	285 gy	} deformációs vázrezgések
228 k	—	

7. táblázat. Az Fe–IAA komplexben megjelenő néhány jellemző rezgési frekvencia. A táblázatban az adott hullámszámnál jelentkező sávok intenzitását a következő rövidítésekkel adtam meg: ie–igen erős, e–erős, k–közepes, gy–gyenge, igy–igen gyenge, sz–széles.

eredményeit használtuk fel.¹⁰ Ennek során az Fe–IBA komplexben a mobilis H atomokat (OH, NH csoportok) D_2O gőzzel való kezelés segítségével deutériumra cseréltük, majd az IR spektrumokban bekövetkezett csúcseltolódások és az irodalomban található, más OH-hidas átmenetifém-komplexekekre mért adatok felhasználásával [41] azonosítottuk a hídhelyzetű OH csoportokat. Az eredeti és a H/D csere utáni Fe–IBA komplexre mért infravörös abszorpciós sávokat a 8. táblázat tartalmazza.

Az adatok közül a legfontosabb az FeOH/FeOD csoportokban a hídhelyzetű OH/OD hajlító rezgéseikhez rendelhető csúcspár, mely a mi kísérleteinkben az 1093 és 912 cm^{-1} hullámszámoknál található. Emellett az Fe_2OH csoport jelenléte esetén az Fe–O vegyértékrezgéseinek, az Fe_2OH síkból történő hajlító és az Fe–O–Fe deformációs rezgési módusainak is el kell a H/D csere miatt tolódniuk. A legnagyobb eltolódást szenvedő sáv hullámszáma 480 cm^{-1} -ről 473 cm^{-1} -re változott a deuterálás során; ez a csúcs azonosítható a Fe_2OH csoport egyik Fe–O vegyértékrezgéseként. Az irodalomban a

¹⁰Mivel az Fe–IAA és az Fe–IBA komplexek szerkezete azonosnak adódott, az Fe–IBA komplexre elvégzett deuterálásos mérést az Fe–IAA esetében már nem ismételtük meg.

Abszorpciós sávok (cm^{-1})		
Fe-IBA (+H ₂ O gőz)	Fe-IBA (+D ₂ O gőz)	Asszignáció
3613 gy	2696 gy	OH/OD vegyértékrezgés
3554 gy	2613 gy	OH/OD vegyértékrezgés
3410 e	2538 e	NH/ND vegyértékrezgés
3331 k, sz	2489 k, sz	$\left\{ \begin{array}{l} \text{OH/OD vegyértékrezgések} \\ \text{erős H-kötés esetén} \\ \text{és rezgési felhangjaik} \end{array} \right.$
—	2399 gy, sz	
3114 gy, sz	2377 gy, sz	
—	2260 gy, váll	
1581 gy	1237 k	NH/ND deformációs rezgés
1226 gy	1139 gy	CN vegyértékrezgés (gyűrű)
1093 k	912 gy, k	$\left\{ \begin{array}{l} \text{OH/OD síkbeli deformációs} \\ \text{rezgés} \end{array} \right.$
1070 igr	850 gy, k	
582 k	567 k	Fe–OH/OD–Fe síkra merőleges deformációs rezgés (hídhelyzetű Fe ₂ OH)
480 k	473 k	Fe–O vegyértékrezgés (hídhelyzetű Fe ₂ OH)
233 igr	228 gy	Fe–O–Fe deformációs rezgés

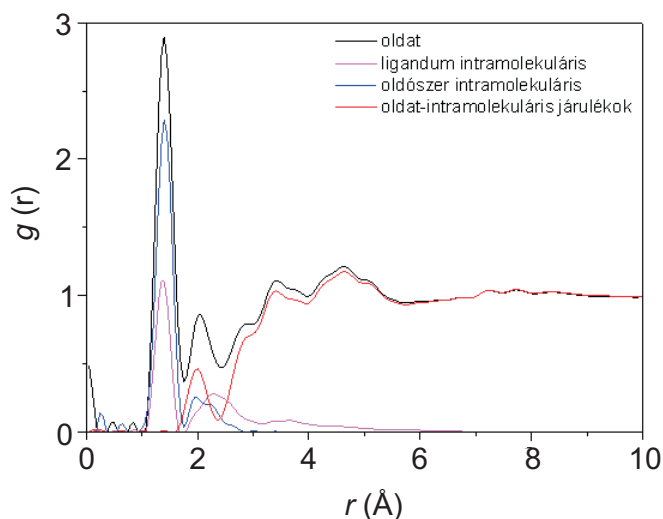
8. táblázat. A deuterálás hatására elmozduló rezgési sávok az Fe-IBA komplex esetén. A sávok azonosítása a H₂O és D₂O gőzöknek kitett komplexek spektrumainak különbsége alapján történt. A táblázatban az adott hullámszámnál jelentkező sávok intenzitását a következő rövidítésekkel adtam meg: ie-igen erős, e-erős, k-közepes, gy-gyenge, igr-igen gyenge, sz-széles.

Fe^{III}, Cr^{III}, Co^{III} OH-hídon át kapcsolódó oxalát- és bipiridilkomplexei esetén 500/540, 550/570 és 550/580 cm^{-1} értékeknél látható deuterálás hatására eltolódás [41]. Az általunk végzett mérésben az Fe₂OH/Fe₂OD síkra merőleges deformációs és a Fe–O–Fe deformációs rezgési módusai 582/567 és 233/228 cm^{-1} -nél jelentkeznek.

A fém–karboxilát típusú komplexek esetén fontos a fém–ligandum vegyértékrezgések azonosítása. Ez utóbbiak a távoli infravörös tartományban várhatók, 600 cm^{-1} és 300 cm^{-1} között (19. (b) ábra). Az Fe-IAA esetén talált 399 cm^{-1} és 325 cm^{-1} -nél lévő sávok jól mutatják az Fe–O vegyértékrezgéseket a Fe–OOC kötésben. A 300 cm^{-1} alatti tartomány csúcsai a ligandumok vázrezgéseinek tulajdoníthatók.

A folyadék-röntgendiffrakciós analízis során a szerkezeti és párkorrelációs függvények illesztésével sikerült alátámasztani az összes, eddig kapott szerkezeti információt. A szerkezeti függvény szemikvantitatív, előzetes analízise után megfelelő geometriai modell segítségével a modell szerkezeti függvényt illesztettük a kísérletből kapotthoz, majd az illesztett és mért függvények eltérését minimalizálva finomítottuk a geometriai paramétereket. A ligandum (IAA) szerkezeti paramétereit korábbi röntgenkristallográfiás eredmények alapján választottuk meg [42]. Ezeket a paramétereket rögzítve egy kezdeti, durva szerkezetet kaptunk, majd az illesztésben figyelembe vettük a komplex-oldószer és az oldószer–oldószer járulékokat is. A következő lépésben a koordinációs

számok konstans értékei mellett az atom–atom távolságokat és az átlagos távolságtól való eltéréseket finomítottuk, majd ezek után a koordinációs számokat optimáltuk. A folyamat ismétlését egy minimális jósági tényező eléréséig folytattuk. A párkorrelációs függvényt a 20. ábra mutatja, az illesztéseket a különbség párkorrelációs függvényre (a mért oldat és az oldószerből és a ligandumból származó intramolekuláris járulékok különbsége) végeztük el.



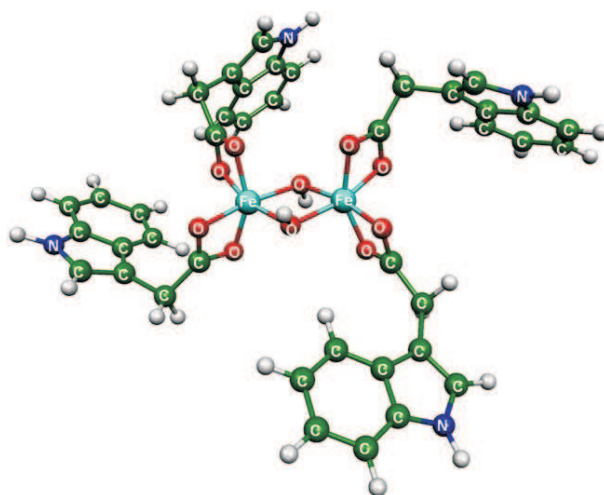
20. ábra. A $[(IA)_2Fe(OH)_2Fe(IA)_2]$ 0.5 M-os metanos oldatában mért párkorrelációs függvény és a számolt oldószer intramolekuláris, ligandum intramolekuláris járulékok, továbbá a különbség = (oldat)–(intramolekuláris járulékok az oldószerből és a ligandumból) párkorrelációs függvény. A modellalkotás és az illesztés a különbséggörbére lett végezve.

Az első csúcs $1,45 \text{ \AA}$ körül több intramolekuláris járulék együttes hatásához rendelhető. Ide sorolhatók a metanol C–O, O–H, a ligandum C–O, C–N, C–H, O–H járulécai. Ezek a kölcsönhatások valószínűleg a következő, 2 \AA -nél található csúcshoz is hozzájárulnak. Ezért a csúcsért azonban főként az Fe–O kölcsönhatás a felelős. A $2,9 \text{ \AA}$ -nél jelentkező váll és a körülötte található tartomány az O–O (komplexbeli és oldószerbeli), az Fe–C, és az Fe–Fe kölcsönhatásokból származik. Egy meglehetősen összetett, jelentős csúcs található $3,5 \text{ \AA}$ körül. Ez kétféle C–O kölcsönhatásból adódhat: egyrészt a metanol molekulák közötti C–O kölcsönhatásból, másrészt a komplexben lévő C atomok és az azt körülvevő metanolmolekulák O atomjai közötti kölcsönhatásból. A $4\text{--}6 \text{ \AA}$ tartományban megjelenő széles csúcs C–C kölcsönhatásokból származik. Ehhez mind a komplex, mind a körülötte lévő szolvátburok hozzájárul, de a csúcs további felbontása összetettsége miatt nem lehetséges.

Az illesztések során kapott végső szerkezeti paramétereket a 9. táblázatban foglaltam össze. Az illesztés során a Fe–O távolság $2,00 \pm 0,01 \text{ \AA}$ -nek, a Fe–Fe távolság

koordinálódó atomok	r (Å)	n	l (Å)
komplex			
Fe–O	2,00 (1)	5 (1)	0,10
Fe–Fe	3,01(1)	1,00(1)	0,20
Fe–C1	2,9(2)	2,00(5)	0,2
Fe–C2	3,96 (5)	3,8 (5)	0,25
Fe–C3	4,64 (5)	3,4 (5)	0,35
Fe–C4	5,00*	6*	0,35*
O–O (OH híd)	2,50(3)	1(2)	0,10
O–O (Fe körül)	2,83(2)	2,8(5)	0,10
C–C1	4,75*	2*	0,25
C–C2	5,20*	2*	0,30
oldószer			
O–O	2,85(5)	4,0(5)	0,17
C–O	3,46(5)	2,8(5)	0,25
C–C	4,61(5)	4,6(5)	0,40
komplex–oldószer			
C–O	3,58(8)	2*	0,30

9. táblázat. A $[(\text{IA})_2\text{Fe}(\text{OH})_2\text{Fe}(\text{IA})_2]$ komplexre kapott szerkezeti paraméterek 0,5 M metanolos oldatban. A zárójelben az utolsó értékes jegy hibáját tüntettem fel. A *-gal jelölt paraméterek az alkalmazott modellből adódtak, értékeit a paraméterek optimalása során állandónak tekintettük (r : atom–atom távolságok, n : koordinációs szám, l : átlagos távolság körüli szórás)



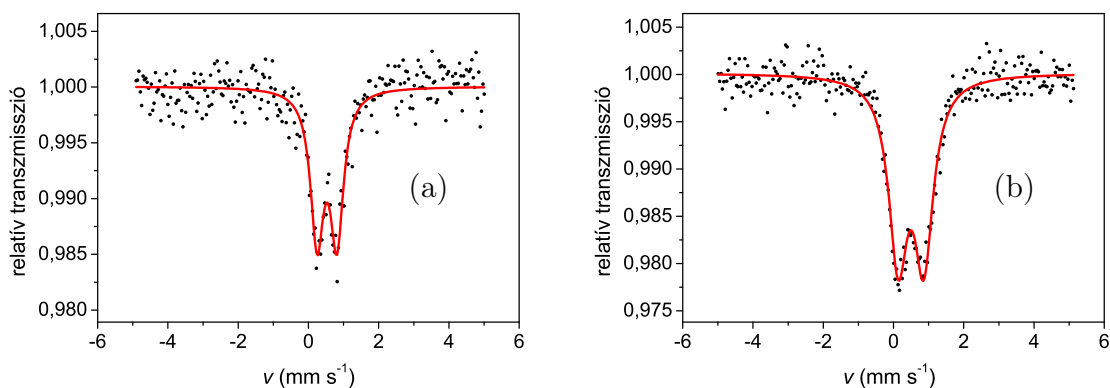
21. ábra. Az $[(\text{IA})_2\text{Fe}(\text{OH})_2\text{Fe}(\text{IA})_2]$ komplex sematikus szerkezete gömb és pálcika modell segítségével ábrázolva.

$3,01 \pm 0,01 \text{ \AA}$ -nek, az átlagos Fe–O koordinációs szám pedig $5,00 \pm 0,01$ -nek adódik. Az O–O és a Fe–Fe koordinációs szám az OH-hídnak megfelelően $1,00 \pm 0,01$. Ezek a paraméterek jó egyezést mutatnak a vizes Fe^{3+} -oldatokban a hidrolízis során kialakuló dimer és polimer, OH-hídon összekötött Fe-komplexekre ($[(\text{H}_2\text{O})_4\text{Fe}(\text{OH})_2\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4]^{4+}$) kapott irodalmi adatokkal [43]. Minden Fe atomot hat O atom vesz körül: ezek közül négy a deprotonált IAA-ból (IA), kettő az OH-hídból származtatható. A komplexet ezen felül metanolmolekulák veszik körül, melyek a központi Fe^{3+} -ionok körül egy második ligandumszférát képeznek. Ez utóbbi kb. két metanolmolekulát jelent minden C atomra, $3,58 \pm 0,08 \text{ \AA}$ távolságra. Az $[(\text{IA})_2\text{Fe}(\text{OH})_2\text{Fe}(\text{IA})_2]$ komplex általunk kapott paraméterek alapján megszerkesztett, idealizált szerkezete a 21. ábrán látható.

2.4.4. A víz hatása a vas–indolecetsav komplex szerkezetére

A vas–indolecetsav elegyek vizsgálata esetén mind a Mössbauer-spektroszkópiás, mind a spektrofotometriás mérések mutatták, hogy a Fe^{3+} -ionok és IAA reakciójához víz jelenléte szükséges. A vas IAA hatására bekövetkező redukciója, illetve a Fe–IAA komplex képződése csak megfelelő mennyiségű víz esetén volt kimutatható. A spektrofotometriás mérések alapján a szilárd Fe–IAA szerves oldószerben történő ismételt oldása után víz hozzáadása nem változtatta meg a komplex abszorpciós spektrumát (14. ábra). A víz Fe–IAA komplex szerkezetére gyakorolt hatásának további vizsgálatához Mössbauer- és IR-spektroszkópiás méréseket végeztem.

A Mössbauer-mérésekhez a szilárd anyagot etanol, aceton oldószerekben feloldottam, majd a rendszerhez vizet adtam 1:50 víz:etanol és víz:aceton térfogatarányban (ez kb. 12 molekula vizet jelent vasatomonként). A víz hozzáadása után mért Mössbauer-spektrumokat és a spektrumok paramétereit a 22. ábra és a 10. táblázat tartalmazza.



22. ábra. A szilárd Fe–IAA komplex (a) etanol–víz és (b) aceton–víz elegyében készített oldatainak Mössbauer-spektrumai 20 perc elteltével fagyasztva.

minta	komponens	δ (mm s ⁻¹)	Δ (mm s ⁻¹)	Γ (mm s ⁻¹)	$S(\%)$
Fe-IAA etanol-víz	Fe ³⁺ -IAA dimer	0,529(9)	0,570(2)	0,45(3)	100
Fe-IAA aceton-víz	Fe ³⁺ -IAA dimer	0,498(8)	0,73(1)	0,65(2)	100

10. táblázat. A szilárd Fe-IAA komplex etanol-víz és aceton-víz elegyében készített oldatainak Mössbauer-paraméterei.

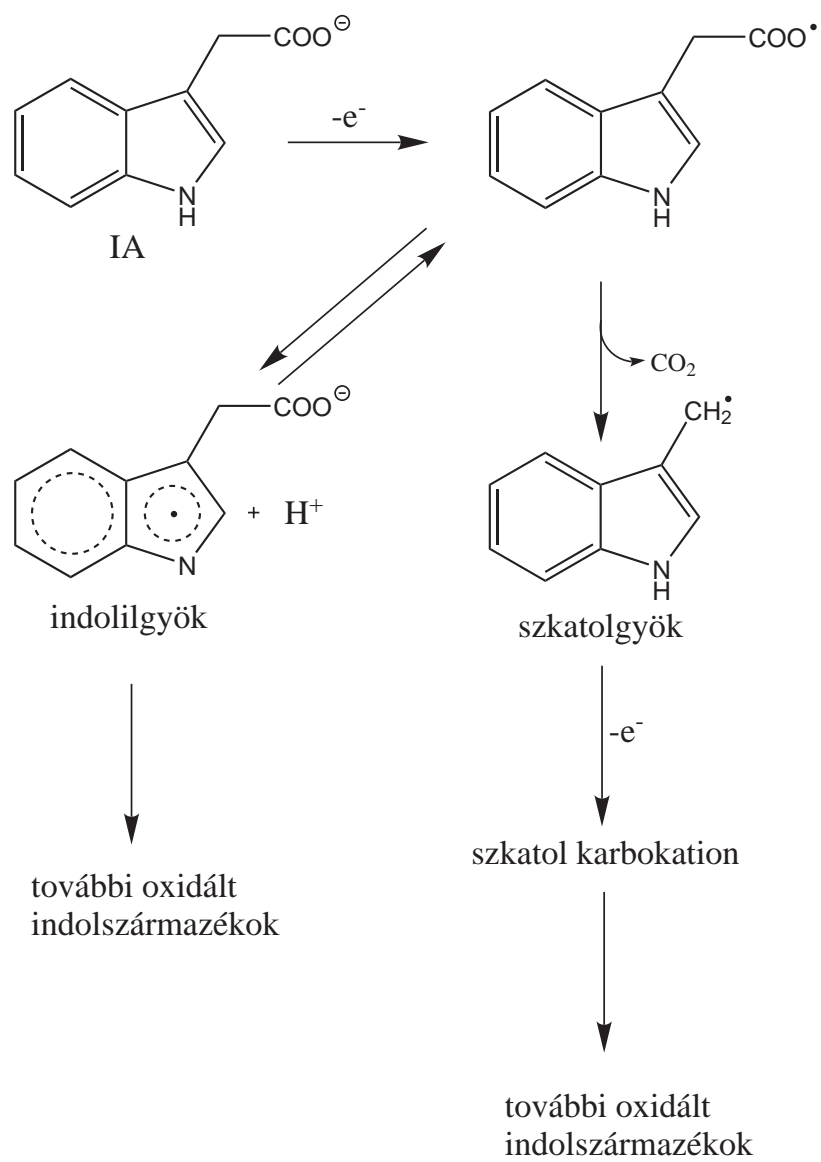
A Mössbauer-spektrumokat és paramétereket a szilárd anyag spektrumával és paramétereivel (17. ábra, 4. táblázat) összevetve látható, hogy a vas a vizet tartalmazó oldatokban is +3 oxidációs állapotban van jelen. Ezekben az oldatokban tehát redukció nem mutatható ki, a dimer [(IA)₂Fe(OH)₂Fe(IA)₂] komplexben található vas oxidációs állapota nem változik meg. A kvadrupólusfelhasadás növekedése azonban a komplex szerkezetében víz hatására bekövetkező változásokat jelez. Valószínűleg a H₂O molekulák is szerepet kapnak a koordinációban. IR mérések segítségével ez utóbbi változást sikerült bizonyítani: deuteroacetonban elvégzett folyadék IR mérések szerint az oldás során víz hozzáadására COOH csoportokra jellemző abszorpciós frekvenciák jelentek meg, illetve a Fe–O vegyértékrezgések magasabb hullámszámok felé tolódtak. A két eredmény alapján a Fe–OOC kötések részleges felbomlását feltételezhetjük, ahol a szabad koordinációs helyeket H₂O molekulák foglalhatják el.

2.4.5. A vas-indolecetsav között lezajló redukció lehetséges mechanizmusa

Amint az előzőekben részletesen bemutattam, megfelelő mennyiségű víz jelenlétében az IAA Fe³⁺-ionok hatására kétféle átalakuláson megy keresztül. Az egyik reakció a [(IA)₂Fe(OH)₂Fe(IA)₂] komplex képződése, mellyel párhuzamosan a Fe³⁺-IAA között egy redoxireakció is lejátszódhat.

Irodalmi adatok szerint az IAA oxidálódásának indító reakciólépése az aromás rendszerből egy egyelektron-vesztéssel kialakuló gyök, mely a pH-tól függően indolilgyökké (lúgos közeg) vagy szkatolgyökké (savas közeg) alakulhat (23. ábra). Az IAA peroxidáz enzimek hatására végbemenő oxidációja esetén kimutatták, hogy az enzim oxidált (Fe³⁺-tartalmú) formája és az IAA között az elektronátmenet nem közvetlenül játszódik le, hanem a már említett szkatolgyök felelős az enzim redukált (Fe²⁺-tartalmú) formájának kialakulásáért [19]. A szkatolgyök képződéséhez a rendszerben egy enzim-oxigén-IAA hármas komplex kialakulása szükséges, anaerob körülmények között nem történik reakció.

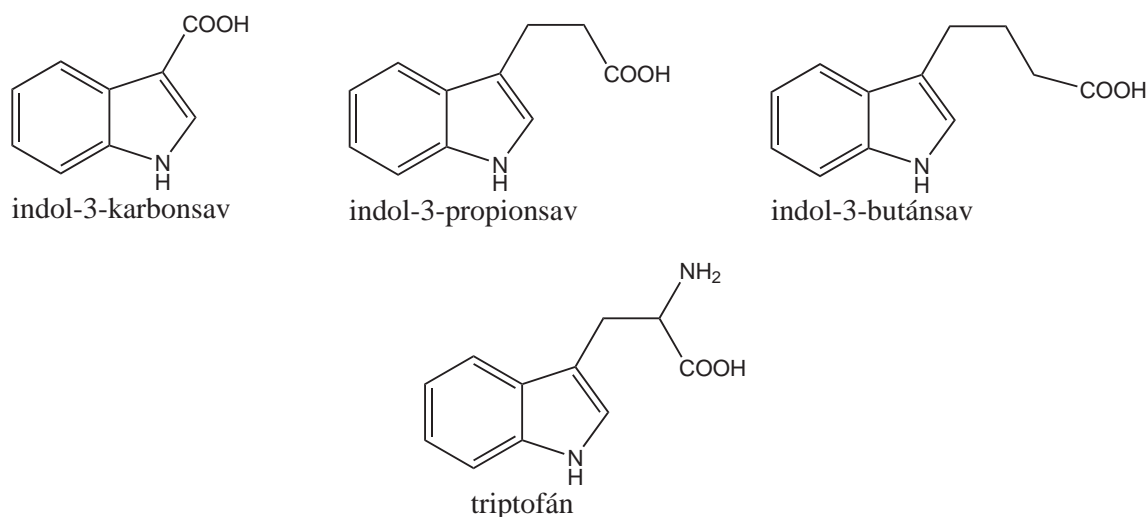
A 23. ábrán feltüntetett első lépés az egyelektron-átmenet, irodalmi utalások szerint oxigén jelenlétében az IAA vizes oldatában spontán is végbemehet, ami az ezáltal



23. ábra. Az IAA oxidációjának lehetséges kezdeti lépései [25] alapján.

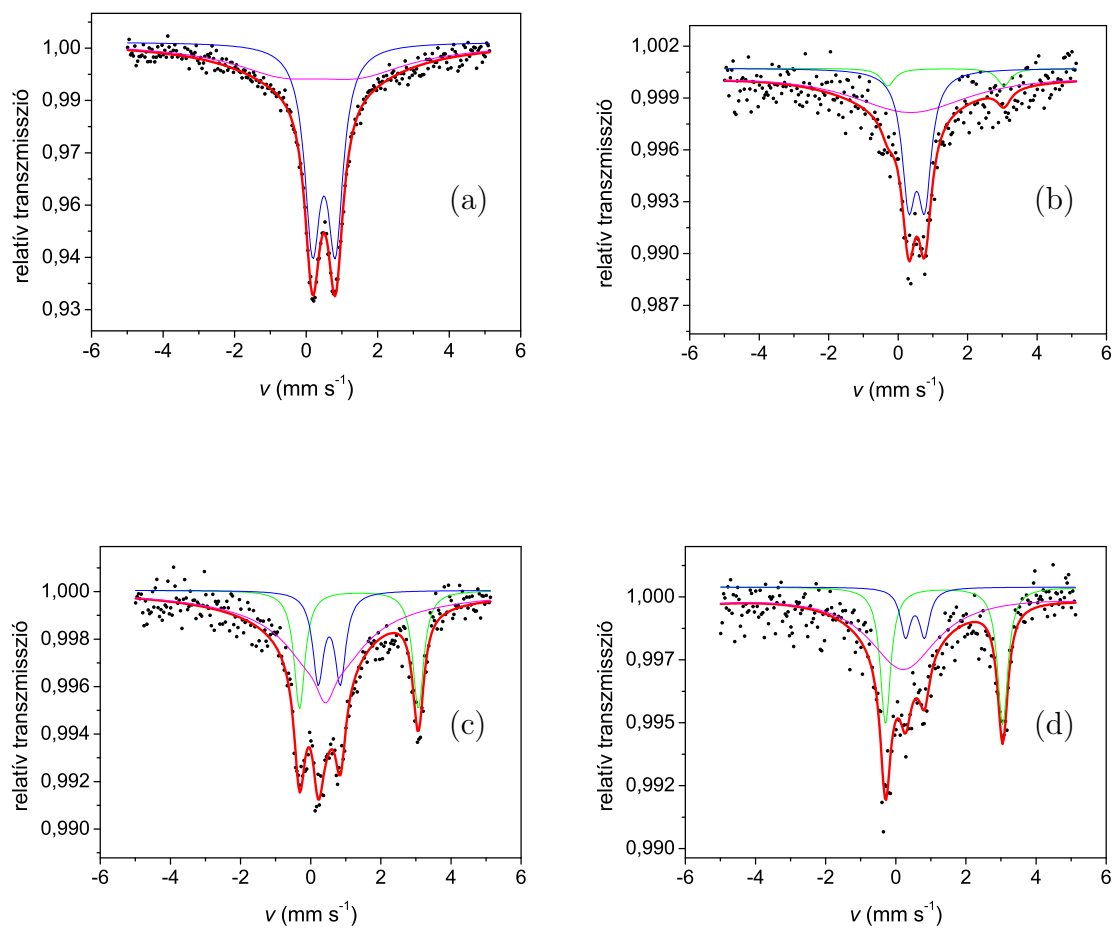
kialakuló gyök dekarboxileződéséhez vagy deprotonálódásához vezet [19–21]. Az irodalom alapján az esetleges további redoxireakciók kiindulóvegyülete a dekarboxileződési reakcióban kapott szkatolgyök.

Az elmondottak szerint az általam összeállított Fe^{3+} -IAA rendszerekben tapasztalt Fe^{3+} -redukció valószínűleg nem közvetlen Fe -IAA elektronátmenet során valósul meg, hanem elsősorban a már említett, IAA-ból oxigén jelenlétében képződő szkatolgyök reagálhat az oldatban lévő Fe^{3+} -ionokkal. Ezt a feltételezést megerősíti, hogy az IAA-val analóg szerkezetű, de oldalláncukban eltérő molekulák azonos reakciókörülmények között változó mennyiségű Fe^{2+} kialakulását eredményezik. Ezt a kísérletet indol-3-karbonsav (ICA), indol-3-propionsav (IPA), indol-3-butánsav (IBA) és triptofán (TRP) segítségével végeztem (24. ábra), a vizes oldatok 15 perc reakcióidő után kapott Mössbauer-spektrumai a 25. ábrán láthatóak.



24. ábra. A redukció mechanizmusának vizsgálatához felhasznált, IAA-hoz hasonló szerkezetű ligandumok szerkezeti képletei.

A spektrumokat az IAA esetén kapott spektrummal összevetve (10. (a) ábra, 24. oldal) látható, hogy TRP esetén nincs redukció, míg az ICA kevesebb, az IPA, IBA közel azonos mértékű redukciót eredményez. Az oldallánc összetételének változtatása elsősorban a dekarboxileződési reakcióra lehet hatással (pl. TRP esetén kimutatták, hogy pH 7-en nem történik dekarboxileződés [26]), ami egyben a további redoxireakciókat, így a Fe^{3+} -ionoknak történő elektronátadást is meghatározza. Természetesen a fent vázolt mechanizmus bizonyításához további kísérletek szükségesek.



25. ábra. Az IAA tartalmú oldatokkal azonos körülmények között készített (a) Fe^{3+} -TRP, (b) Fe^{3+} -ICA, (c) Fe^{3+} -IPA, és (d) Fe^{3+} -IBA oldatok Mössbauer-spektrumai 80 K hőmérsékleten, 15 perc állás után fagyasztva.

3.

A növényi vaskfelvétel vizsgálata

3.1. A kutatás háttere

3.1.1. A növények ásványos táplálkozása

Egyes szervesetlen sók növényi növekedésre gyakorolt kedvező hatását a mezőgazdaságban már több, mint 2000 éve ismerik. Már az ókorban meszet és növényi hamut adagoltak a talajhoz, hogy a növények terméshozamát növeljék. Ennek ellenére 150 évvel ezelőtt még tudományos viták folytak arról, milyen mértékben szükséges a növények fejlődéséhez a szénen, hidrogénen és oxigénen kívül más elemek jelenléte. A növények ásványos táplálkozása mint önálló tudományág létrejött Justus von Liebig (1803–1873) munkásságához kötődik. Tudományosan megalapozott, kísérletekkel alátámasztott ismeretek azonban csak a XIX. század második felében és a XX. század elején születtek.

A növényi szövetben mintegy 40–50 elemet sikerült kimutatni, de ezek közül csak néhány tekinthető az életfolyamatokhoz nélkülözhetetlennek, ezeket esszenciális tápelemeknek¹¹ nevezzük. Az esszenciális tápelemekből a növények szükséglete igen változó. A nagyobb mennyiségben szükséges elemeket (nitrogén, kálium, kalcium, foszfor, magnézium, kén) makroelemeknek, a kisebb mennyiségben szükségeseket (klór, bór, vas, mangán, cink, réz, molibdén) mikroelemeknek nevezzük. Egyes elemek, mint a nátrium, szilícium, szelén, kobalt, kedvező növényélettani hatása ismert, azonban nélkülözhetetlenségük egyelőre nem bizonyított. Az egyes elemek szöveteken belüli átlagos koncentrációját a 11. táblázat mutatja. A növények ásványos táplálkozását számos monográfia összefoglalja, ezek közül nemzetközi szinten is legjelentősebb Horst Marschner munkája [45], de magyar nyelvű szakirodalmat is említhetünk [46].

Az anyagcsere meghatározó lépései az anyagok mozgása a sejt és környezete, valamint a sejtszervek és a citoszól között. A növényi sejt vázlatos felépítését a 26. ábra mutatja. Az állati sejtekhez képest a legfontosabb különbség a sejt membránját határoló sejtfal jelenléte. A sejtfal két fő komponensből áll: egy orientált mikrofibrilláris struktúrából és a mátrixból, melybe ez a rendezett struktúra beágyazódik. A növényi

¹¹Az esszenciális tápelem kifejezést először Arnon és Stout javasolta 1939-ben [44]. Ahhoz, hogy egy elemet esszenciálisnak tekintsünk, három feltételnek kell teljesülnie: (i) az adott elem hiánya esetén a növény elpusztul, mielőtt életciklusát befejezné, (ii) funkciója nem helyettesíthető valamely más elemmel, (iii) közvetlenül részt kell vennie az anyagcserében, pl. egy enzim komponenseként.

Elem	Abszorbeált forma	Koncentráció a növényben ($\mu\text{mol/g}$ száraztömeg)
------	-------------------	--

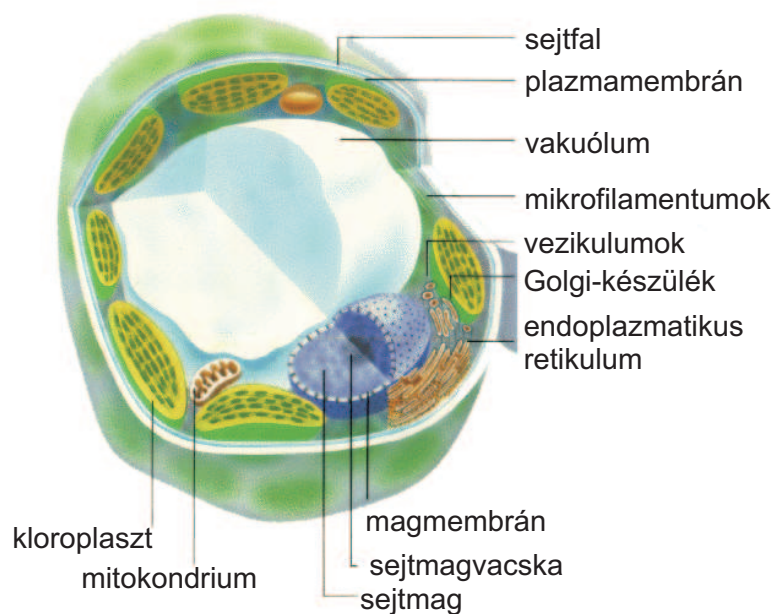
MAKROELEMEEK

nitrogén	NO_3^- , NH_4^+	1000
kálium	K^+	250
kalcium	Ca^{2+}	125
foszfor	H_2PO_4^-	60
magnézium	Mg^{2+}	80
kén	SO_4^{2-}	30

MIKROELEMEEK

klór	Cl^-	3,0
bór	BO_3^{3-} , $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$	2,0
vas	Fe^{3+}	2,0
mangán	Mn^{2+}	1,0
cink	Zn^{2+}	0,30
réz	Cu^+ , Cu^{2+}	0,10
molibdén	MoO_4^{2-}	0,001

11. táblázat. A növények esszenciális elemtartalma [45] alapján.

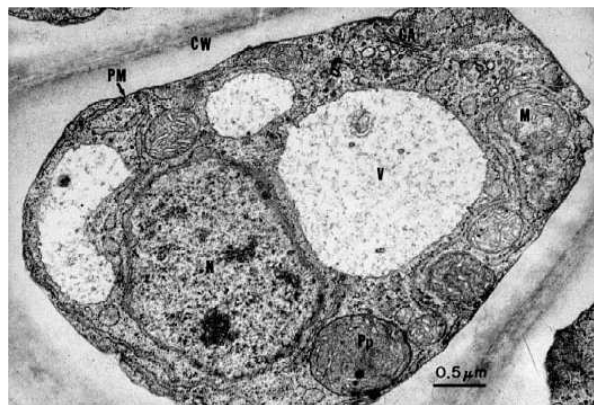


26. ábra. A növényi sejt vázlatos felépítése.

sejtfalnak két fajtáját különböztetjük meg: az elsődleges (primer) sejtfalat és a másodlagos (szekunder) sejtfalat. A primer sejtfalat hemicellulóz, cellulóz, pektin, különböző sejtfalfehérjék, sejtfalenzimek alkotják. A szekunder sejtfal fehérjéket nem tartalmaz, a mátrix anyagai közül többnyire hiányzik a pektin, cellulóztartalma jóval magasabb a primer sejtfalénál. Különböző járulékos anyagok (lignin, kutin) lerakódása miatt a másodlagos sejtfal megvastagszik, további megnyúlásra képtelen, merev struktúrát alkot.

A sejt tápanyagfelvételében a sejtfal fontos szerepet tölt be: hálózatos állománya nagy felületet biztosít az oldatban lévő ionok megkötésére, illetve különböző átmérőjű pórusai lehetővé teszik a nagy molekulatömegű anyagok kiszűrését.¹² Emelett fontos megemlíteni a sejtfal ioncserélő képességét is, mely a jelentős mennyiségű poligalakturonsav jelenlétének köszönhető.

A sejtfal állománya alatt található a sejtet határoló membrán (plazmamembrán), mely kb. 10 nm vastag, egyrétegű membrán. A sejt belsejében (citoplazma) számos sejtszervecske különíthető el. Ezek közül az anyagraktározás szempontjából legjelentősebbek a vakuólumok¹³ és a plasztiszok¹⁴. Transzmissziós elektronmikroszkópos képen a sejtszervecskék könnyen azonosíthatók (27. ábra).



27. ábra. Algasejt transzmissziós elektronmikroszkópos képe. V: vakuólum, CW: sejtfal, PM: plazmamembrán.

Az anyagfelvétel és a különböző távolságokra történő anyagszállítás magyarázatára fontos bevezetni az apoplaszt és a szimplaszt fogalmát [45]. Az apoplaszt a sejtfalak összességét jelenti (pontosabban minden membránon kívül eső részt). Összefüggő, há-

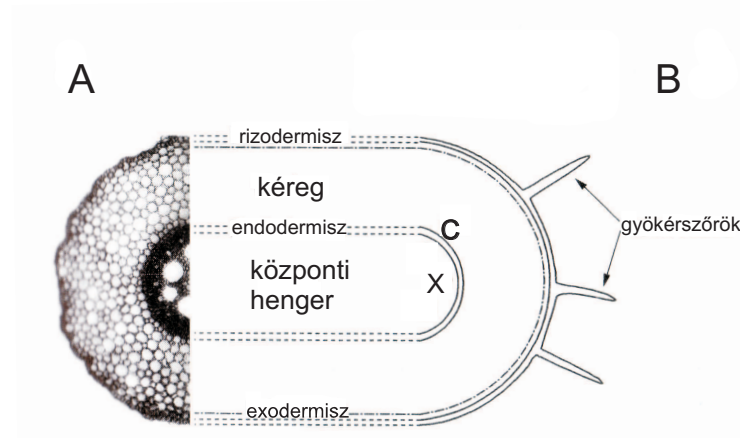
¹²Irodalmi adatok szerint a pórusok maximális átmérője 5 nm körül van [47].

¹³Egyrétegű membránnal határolt szerkezeti elemek, melyek az érett növényi sejt térfogatának mintegy 90%-át teszik ki. A vakuólumban a legkülönbözőbb anyagok halmozódhatnak fel: szervetlen ionok, aminosavak, cukrok, speciális anyagcseretermékek. A vakuólum a sejt anyagcseréjét tekintve úgy viselkedik, mint egy „külső tér”, a membránján átjutott anyagok a későbbiekben már nem befolyásolják az anyagcserét.

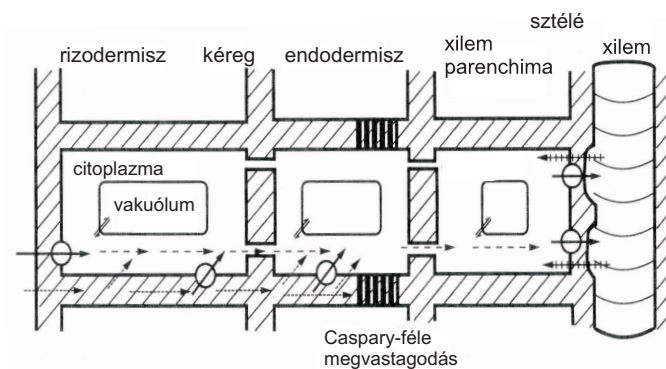
¹⁴Endoszimbionta eredetű, kettős membránnal határolt sejtoranellumok, melyek keményítőt, zsírokat, fehérjéket raktározhatnak.

lózatos állománya biztosítja az adott szövet sejtjei számára a külső térrel (táp-, illetve talajoldattal) történő megfelelő érintkezést. A szimplaszt alatt a citoplazmák rendszerét értjük. A szomszédos sejtek citoplazmáit plazmafonalak (az ún. plazmodezmák) kötik össze, melyeknek köszönhetően a szimplaszt is összefüggő szerkezetű.

A tápanyagfelvétel és az anyagtranszport elsődleges szerve a gyökér. A gyökér szövetfajtáinak elhelyezkedését a 28. ábra, a gyökérsejtek közötti transzportfolyamatokat a 29. ábra szemlélteti. Mielőtt az egyes anyagok elérik a plazmamembrán felületét,



28. ábra. A) Kukorica gyökér keresztmetszeti képe. B) A gyökér keresztmetszetének vázlatos felépítése X: xilem, C: Caspary-féle megvastagodás.



29. ábra. A gyökérsejtek közötti transzportfolyamatok vázlatos ábrája [46] alapján. Az ábrán kör jelzi az aktív transzportot végző enzimeket.

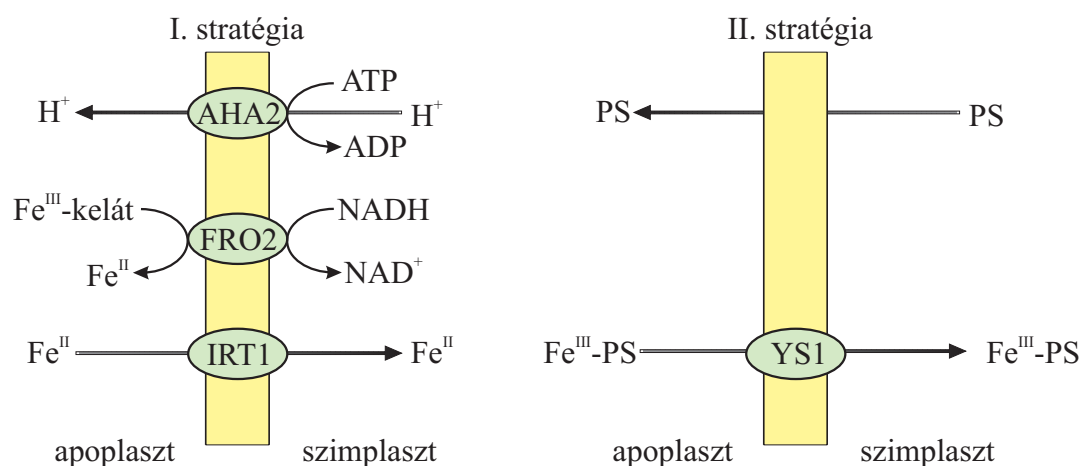
érintkezésbe kell kerülniük az apoplaszttal. Az apoplaszton belül az egyes anyagok passzív transzportja valósul meg, ami által mind a rizodermisz, mind a kéreg sejtjei érintkezésbe kerülhetnek a táp- vagy talajoldattal. Ezt a transzportfolyamatot viszont az endodermiszben lerakódó hidrofób anyagok akadályozzák (ez a lerakódás alkotja a Caspary-féle megvastagodást), így a központi hengerben (sztélé) elhelyezkedő szállítóelemek (xilem-parenchima, xilem) sejtjeibe már csak a plazmamembránon keresztül

történő transzport után juthatnak be az egyes tápelemek (ez utóbbi folyamat nagyrészt aktív transzport).

3.1.2. Vasfelvételi mechanizmusok és a vas transzlokációja a növényi szövetekben

A vas a növények számára az egyik legfontosabb esszenciális mikroelem. A talajban általában oxidok, szilikátok, foszfátok és szulfidok alakjában fordul elő. A talajok nagy részében az összvastartalom jelentősen meghaladja a növények szükségleteit, viszont a ténylegesen felvehető (oldható formában jelen lévő) vas koncentrációja az említett ásványok – főként az oxidok – széles pH tartományban fellépő rossz oldódása miatt csekély. A talajbeli vas felvehetőségét sok tényező befolyásolja. Figyelembe kell venni a szilárd anyag szemcseméretét, a talajoldat pH-ját, ionerősségét, illetve a komplexképző ligandumok (többnyire szerves savak) jelenlétét is. Az irodalom alapján az egyes vas-oxidok oldhatósági szorzatai nagyságrendileg 10^{-44} és 10^{-34} között vannak [48]. Az igen gyakori hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) és goethit ($\alpha\text{-FeOOH}$) a legkevésbé oldható vas-oxidok közé tartoznak. A viszonylag jobban oldódó $\text{Fe}(\text{OH})_3$ -ból pH = 4-en még 10^{-7} mol dm $^{-3}$ van oldatban, azonban egységnyi pH emelkedés során az oldhatóság ezred részére csökken. A növények normális életműködéséhez 10^{-8} mol dm $^{-3}$ oldatbeli vaskoncentráció a kritikus alsó érték [49]. Mivel a talajok pH-ja általában 4–9 között változik (ezen kívül eső értékek toxikusak a növény, elsősorban a gyökér számára), így a vas elérhetősége a növények szempontjából legtöbb talaj esetén erősen korlátozott [46]. A vashiányos állapot elkerülése érdekében tehát szükségessé vált olyan aktív transzportmechanizmus kialakítása, mely megfelelő hatékonysággal képes a talajbeli vasat mobilizálni és a gyökér sejtjei számára elérhetővé tenni.

A növények kétféle stratégiát fejlesztettek ki a vas felvételére [50, 51]. Az első stratégiát követő növények (kétszikűek és a fűfélék kivételével az egyszikűek) a vasat, mely aerob körülmények között Fe^{III} állapotban fordul elő, először a plazmamembrán felületén redukálják, majd a képződött Fe^{II} -t transzportálják a sejt citoplazmájába (30. ábra). A redukción speciális enzimek végzik, melyek közül elsőként az FRO2-nek nevezett vas-kelát reduktáz enzim génjét azonosították *Arabidopsis thaliana*-ból [52]. Később megtalálták ennek analógjait is. A vas-kelát reduktázok működésükhöz a citoplazma FADH_2 vagy NADH vegyületeit használják elektrondonornak. A keletkező, +2 oxidációs állapotú vasat egy kétértékűkation-transzporter, az IRT1 juttatja be a sejtbe [53]. A redukción sebessége vashiányos esetben növekszik [54], illetve a gyökerek protonleadása (ezáltal a rizoszféra erőteljes savasodása) is fokozódik [51]. Néhány növényfaj esetén az említett változások mellett megfigyeltek a vashiány hatására bekövetkező morfoló-



30. ábra. Az I. és II. vasfelvételi stratégiát követő növények vasfelvételi mechanizmusa (AHA2: Arabidopsis (P-típusú) H^+ -ATPáz, FRO2: vas(III)-kelát reduktáz, IRT1: vas(II) transzporter, PS: fitosziderofór, YS1: vas(III)-fitosziderofór transzporter).

giai módosulásokat is, pl. az oldalgyökerek megrövidülését, transzfersejtek¹⁵ fokozott képződését, fenolos anyagok szintézisét és leadását [55].

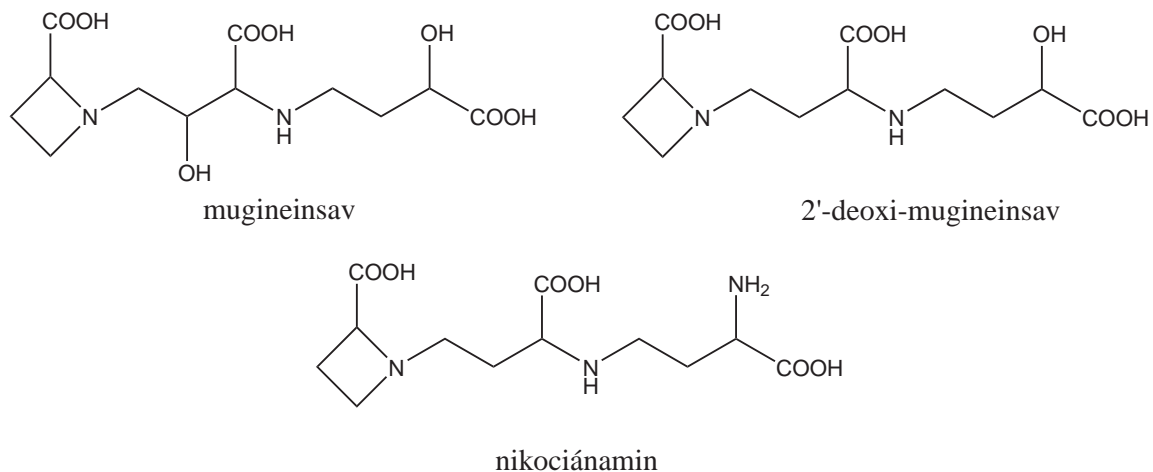
A második stratégiát követő növények (fűfélék) speciális, vas(III) komplexálására képes vegyületeket (fitosziderofórokat) szintetizálnak, és adnak le a rizoszférába (30. ábra). A Fe^{III} -fitosziderofórok rendkívül stabil komplexek (stabilitási állandójuk 10^{33} nagyságrendbe esik [56]), melyek membránon keresztül történő transzportja enzimatikusan zajlik (YS1 transzporter).¹⁶ A leggyakrabban előforduló fitosziderofór a mugineinsav és a 2'-deoxi-mugineinsav, melyek szerkezeti képletét és szintézisük egyik kiindulási vegyületét, a nikociánamint a 31. ábra mutatja.

Jóllehet a vasfelvételi mechanizmusok genetikai háttere, a vasfelvétel regulációja egyre részletesebben ismert, a vas apoplaztbeli megkötése, a plazmamebránon keresztüli transzportot követő további átalakulásai, a gyökérből más vegetatív szervekbe történő transzportja részleteiben máig nem tisztázott. A talaj- és a tápoldatban jelen lévő részecskék – ahogy a sejtfal szerepének tárgyalásánál említettem – először a sejtfalban adszorbeálódnak, illetve a szövet azon részében, melybe a víz és az oldott anyagok egyaránt behatolnak (32. ábra). A sejtfal ez utóbbi részét szabad helynek nevezzük.¹⁷ A Fe^{3+} -ionok egy része a sejtfal negatív töltéseit adó galakturonsavak karboxilcsoportjain kötődik meg (Donnan free space, DFS), vagy a sejtek által leadott

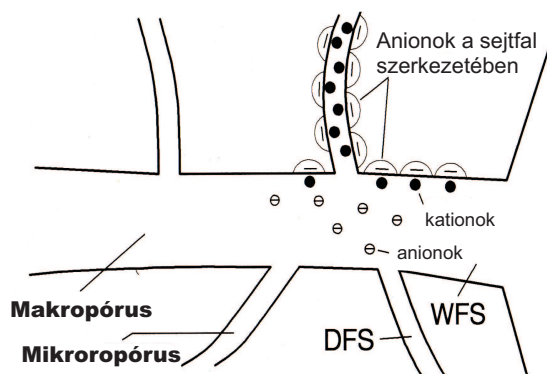
¹⁵Nagy membránfelülettel rendelkező sejtek, melyek nagy mennyiségű anyag szállítására specializálódtak.

¹⁶A fitosziderofór szintézis és Fe^{III} -fitosziderofór transzport genetikai hátterével részletesen számos irodalom foglalkozik [57, 58].

¹⁷A szabad hely meghatározása kísérletileg nehézségekbe ütközik, helyette az ún. látszólagos szabad hely (apparent free space, AFS [59]) értékét szokták megadni. Az AFS egy hipotetikus térfogatot jelöl, mely abban az esetben egyezik meg a szabad hely térfogatával, ha a sejtfalban és a sejtfalon kívül lévő oldat koncentrációja pontosan megegyezik.



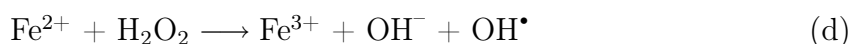
31. ábra. A mugineinsav, a 2'-deoxi-mugineinsav és a nikociánamin szerkezeti képlete.



32. ábra. A sejtfa pórusainak sematikus felépítése. WFS (water free space), víz szabad hely: a külső oldat szabadon áramolhat, azaz az anyagokat a külső oldattal azonos koncentrációban tartalmazza; DFS (Donnan free space), Donnan szabad hely: a kationok megkötődnek a sejtfa negatív töltést hordozó karboxilát csoportjain.

szerves savak (citromsav, almasav) komplexeként oldatban marad (water free space, WFS). Az anionok és a töltéssel nem rendelkező részecskék szintén oldatban maradnak a mikro- és makropórusok üregeiben [45]. A fent említett folyamatokat természetesen nemcsak a növény, hanem maga az oldatban található vasvegyület is befolyásolja.¹⁸ Adott tápoldat-összetételekre analitikai szoftverek segítségével (pl. MinteqA2 [61]) meg lehet becsülni a Fe^{III} különböző formáinak százalékos arányát, ami segítséget nyújthat a sejtfalban lejátszódó folyamatok megértéséhez.¹⁹ Az apoplastban jelen lévő különböző vasformákról pontos kísérleti információk nincsenek, általában csak mennyiségi analitikai mérések az apoplast és szimplaszt összes vastartalmára vonatkozólag [54, 63].²⁰

A vas sejtben belüli formája és mennyisége szigorúan szabályozott, mivel a komplexbe nem kerülő, illetve más vegyületben nem kötött, ionos formájú vas reaktivitása révén toxikus mellékfolyamatokat indíthatna el. A sejt anyagcsere-folyamataiban képződő szuperoxid és hidrogén-peroxid molekulák a sejt számára önmagukban nem károsak, azonban Fe^{3+} és Fe^{2+} -ionokkal reagálva rendkívül reaktív hidroxil gyököket eredményeznek a sejtben belül (Fenton-reakció) [64]:



Éppen ezért szükséges, hogy a sejt belsejébe belépő vas valamilyen kötött formában raktározódjon, ugyanakkor szükség esetén mobilizálódni tudjon [45]. A vas sejtműködésben közvetlenül részt vevő hányada hem-proteinekként²¹, vas-kén proteinek²² formájában, illetve más enzimek (pl. lipoxigenázok) fémkomponenseként van jelen. Emellett jelentős mennyiség raktározódhat ferritin formájában a nem-zöld plasztiszokban²³, mely egy bármikor remobilizálható vasfelhalmozást tesz lehetővé [65].

¹⁸Különböző ⁵⁹Fe-jelzett vegyületekkel történt vizsgálatok rámutatnak arra, hogy a vas apoplastbeli megkötődését erősen befolyásolja a tápoldatban Fe-forrásként alkalmazott Fe^{III} -kelát (pl. Fe-EDTA, Fe-citrát), illetve jelentős hatással van rá más ionok jelenléte is (pl. a N-forrásként adagolt nitrát, karbamid vagy ammónium) [60].

¹⁹Például Fe^{III} -citrát esetén, módosított Hoagland tápoldatra négy fő vasformát állapítottak meg: 2,8% FeHPO_4^+ , 1,1% FeCit_3 , 71,8% $\text{Fe}[\text{CitOH}]^-$, 24,0% $[\text{Fe}_2\text{Cit}_2(\text{OH})_2]^{2-}$, ahol Cit=citrát [62].

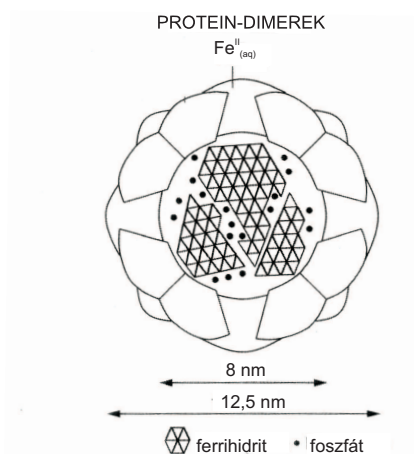
²⁰Kivéve vastúlادagolás vagy szélsőséges környezeti hatások – erősen savas vagy erősen lúgos talajok, fémszennyezés – esetén, ekkor a gyökér felületén kiválhatnak vas-oxi-hidroxidok, szulfát-, illetve foszfáttartalmú ásványok.

²¹A hem tartalmú fehérjék elsősorban a citokrómok, melyek kloroplasztokban, mitokondriumokban, nitrát reduktázokban az elektrontranszport folyamatok lebonyolításáért felelnek. Néhány kataláz és peroxidáz enzim szintén hem-csoportot tartalmaz (ezek lehetnek sejtfalban működő enzimek is, pl. a fenolok ligninné történő polimerizációját katalizáló enzim).

²²A legismertebb közülük a ferredoxin, mely aktív centrumában két Fe-atomot tartalmazó fehérje, számos elektrontranszport-folyamat résztvevője.

²³A levélben a kloroplasztiszok tartalmazzák a legtöbb vasat, mintegy 80%-át a jelen lévő összes vasnak, azonban ezek az elektrontranszport rendszer elemeiként és nem ferritin formájában jelennek meg.

A ferritin az élővilágban széles körben elterjedt vasraktározó fehérje, melyben a fehérjeburok belsejében a vas nanoméretű aggregátumok formájában ferrihidritként van jelen (33. ábra). A ferrihidrit hidratált Fe^{III} -oxidnak tekinthető, melynek szerkezete alacsony kristályos rendezettséget mutat. Por-röntgendiffrakciós analízisek alapján hibahelyekkel rendelkező hematit struktúrájának tekinthető [48]. Pontos összegképletet nem lehet megállapítani, mivel a szerkezetbe beépülő OH és H_2O mennyisége képződési körülményektől függően változik, az összetételre általában jó közelítés a $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ [66]. Ezen kívül a ferrihidrit szerkezetébe foszfát is beépülhet, mely meghatározza annak kristályos rendezettségét. Ásványi magja átlagosan 1800–2500 vasatomból áll, átmérője 5,2–8,0 nm között változik [48, 66]. A növényi ferritin többnyire amorf szerkezetű ferrihidritet tartalmaz, melynek szemcsemérete kisebb, mint az állati szövetekből izolált ferritin vas centruma, és foszfáttartalma is magasabb.



33. ábra. A ferritin sematikus felépítése [48] alapján.

Az eddig felsorolt vasraktározási helyek mellett fontos megemlíteni a sejtben Fe^{III} -komplexek formájában, oldott állapotban lévő vasat is. Régóta ismert, hogy a citromsav – mely nagy mennyiségben termelődik a sejtekben – szerepet játszik a Fe^{III} komplexálásában és szállítószövetbeli transzportjában (a xilemnedvben kimutatták az Fe^{III} -citrát jelenlétét [67, 68]). A sejtekben egy másik potenciális kelátképző a nikociánamin (NA, 31. ábra), mely magasabb rendű növények esetén minden szövetben jelen van, és mind Fe^{3+} , mind Fe^{2+} ionokkal stabil komplexet képez semleges, illetve gyengén lúgos kémhatás esetén [69, 70]. Emellett NA-hiányos *chloronerva* paradicsommutációban megfigyelték a vas vakuólumokban és mitokondriumokban történő kiválását is [71], ami az NA vastranszportban betöltött pótolhatatlan szerepére utal. Pich és munkatársai rávilágítottak arra, hogy az NA koncentráció bab és paradicsom növényekben korrelációt mutat az adott helyen lévő vaskoncentrációval [72]. A fent említett eredmények ellenére az Fe–NA komplex jelenlétét a szimplasztaban kísérletileg még nem sikerült igazolni.

3.1.3. Nehézfémek hatása a növények vasháztartására

A környezetszennyező nehézfémek, melyek széles körben megtalálhatók a különböző talajokban, befolyásolják a növények ionfelvételét, ezen belül jelentősen módosítják a vasfelvételt is. Ezek az anyagok többnyire a növények gyökerében halmozódnak fel, kis részük azonban a növény más vegetatív szerveibe (szár, levél) is transzportálódik. Az egyes szervekben történő felhalmozódás különböző hiánytünetek megjelenését okozza, melyek közül kitűnik a vashiányos állapot. A talajba adagolt mesterséges kelátkézők (pl. EDTA), a talaj pH-ja, huminsav-tartalma mind befolyásolják az említett akkumulációt. A nehézfémionok felvételére, illetve a nehézfémionok és a vasfelvétel kapcsolataira vonatkozó ismereteink egyelőre hiányosak, jóllehet szoros összefüggés mutatkozik a felvételi mechanizmusok között. A kérdés tisztázása fontos lehet nemcsak a növényi ásványos táplálkozás ismerete, hanem a nehézfém-akkumuláció biotechnológiai hasznosítása szempontjából is, hiszen a nehézfémeket felhalmozó növények jól alkalmazhatók szennyezett talajok megtisztítására (fitoremediáció). A nehézfémek, illetve a vas megkötéséről, vegetatív szerveken belüli transzportjáról, nagy mennyiségű nehézfém-szennyezés okozta stresszhatásokról az utóbbi évtizedben számos eredmény született, melyek összefoglalását adja pl. a [73] monográfia.

A rizoszférában a nehézfémionok megkötését – ahogy azt a vas esetére a korábbiakban részletesen megmutattam – elsősorban az apoplaszttal való kölcsönhatás határozza meg. A fémek egyes kelátképzőkkel alkotott komplexeinek stabilitását összevetve megbecsülhető, milyen formák lesznek nagy mennyiségben jelen az apoplasztban (12. táblázat). Sajnos az apoplasztban a szabad ionos kötőhelyeken kötött fémekre az apoplaszt bonyolult szerkezete és sokféle összetevője miatt stabilitási állandókat eddig nem sikerült meghatározni. Emellett nem tisztázott, hogy egyes kelátképzők, pl. az EDTA, milyen mértékben képesek eltávolítani az apoplasztból az ionokat, ezért a nehézfémek apoplasztbeli mennyiségének kísérleti meghatározása is vitatott.

Az apoplasztbeli hatásokon kívül figyelembe kell venni a nehézfémek vas-kelát reduktáz enzim működésére, illetve a vas transzportjáért felelős enzimre gyakorolt hatásait is. Pl. rövid ideig alkalmazott $5\ \mu\text{M}$ Cd^{2+} határozottan csökkentette vashiányosan nevelt cukorrépa növények reduktáz aktivitását [77]. Lucena és munkatársai a következő kölcsönhatások figyelembe vételét javasolták a nehézfémek vas-kelát redukcióra gyakorolt hatásait illetően [78]: (i) kompetitív hatás a redukció szempontjából, amennyiben az adott fém is szubsztrátja lehet az enzimnek, (ii) a reduktáz enzim működésének módosítása, (iii) membránszerkezet, permeabilitás megváltoztatása. Emellett felmerül az a kérdés is, hogy a reduktáz enzim által termelt Fe^{2+} milyen reakcióba léphet a jelen lévő nehézfémekkel.

Fémion	EDTA	Cit	MA	DMA	NA
Fe ³⁺	25,1	11,5	17,7	18,1	20,6
Fe ²⁺	14,3	4,4	10,1	10,4	12,8
Zn ²⁺	16,5	5,0	12,7	12,8	15,4
Cu ²⁺	18,8	5,9	18,1	18,7	
Mn ²⁺	13,9	4,2	8,3	8,3	
Ni ²⁺	18,6	5,4	14,9	14,8	
Cd ²⁺	16,5	3,8			
Pb ²⁺	18,0	4,1			

12. táblázat. Néhány fémkomplex stabilitása ($\log K$ értéke a $M^{n+} + L^{m-} = ML^{m-n}$ egyenletre) [56, 70, 73–75] alapján. EDTA: etiléndiamin-tetraecetsav, Cit: citrát, MA: mugineinsav, DMA: 2'-deoxi-mugineinsav, NA: nikociánamin.

Sajnos a nehézfémek citoplazmabeli viselkedéséről, illetve a vasregulációra gyakorolt hatásairól még kevesebb ismeretünk van. Bizonyított, hogy a nehézfémek jelenléte ún. fitokelatinok²⁴ sejten belüli szintézisét váltja ki, melyek elősegítik a toxikus fémek vakuólumokban történő megkötését [79]. A komplexképzésre potenciálisan alkalmas vegyületek szintézise azonban a citoszolban is felveti az egyes fémionok egymással való versengésének kérdését, főként a fitoremediációban fellépő hiperakkumuláció esetén. A termodinamikai stabilitások ismerete mellett fontos a komplexképződés kinetikájának ismerete is [80], hiszen adott esetben a gyors képződési kinetika lehet a meghatározó tényező.

A nehézfémek xilemben történő szállításával kapcsolatban – az előzőekhez hasonlóan – számos eddig tisztázatlan kérdés van. A vas szállításában egyértelműnek látszik a Fe-citrát szerepe, azonban irodalmi adatok szerint a xilemben az Pb és Cd is képezhet komplexet a citráttal [81, 82].

A nehézfémionok háztartásában tehát meghatározó folyamatnak a különböző kelátképzési mechanizmusok tűnnek: ezek határozzák meg a fémek elérhetőségét, mobilitását, toxicitását. Az előzőeket összefoglalva látszik, hogy számos nyitott kérdés maradt a nem-esszenciális és esszenciális fémek egymásra gyakorolt hatását illetően. A fém-transzport dinamikájának megértéséhez a különböző elemek transzportrendszerének átfedéséről további információk szükségesek.

3.1.4. A növényi hormonok vASFelvételre gyakorolt hatásai

Az IAA vASFelvételben betöltött szabályozó szerepét az 1980-as évektől kezdve kezdték el vizsgálni, azonban eddig igen kevés eredmény született [83]. A vASFelvételben az

²⁴Ciszteinkin gazdag kisméretű peptidek, melyek –SH csoportjuk segítségével megkötik a nehézfémeket.

I. stratégiát követő növények esetén kimutatták, hogy az IAA képes vashiányos állapothoz hasonló tüneteket előidézni. Ez egyrészt morfológiai változásokat (oldalgyökerek rövidülése, transzfersejtek kialakulása), másrészt fiziológiai változásokat (vas-kelát reduktáz aktivitás növekedése, a rizoszféra savasodása)²⁵ jelent. Nem tisztázott azonban, mi az említett folyamatokban az IAA pontos hatásmechanizmusa.

A II. stratégiához tartozó növények esetén még kevesebb információnk van a hormonok vasfelvételre gyakorolt hatásáról. Egyes eredmények feltételezik, hogy az IAA más hormonok (pl. etilén) szabályozásán keresztül hatással van a fitoszteroidfor szintézisre [83]. A kérdést bonyolítja, hogy egyes, rizoszférában élő baktériumok (pl. *Azospirillum brasilense*) képesek IAA szintézisére, és ezért a gazdanövény gyökérzetének fejlődésére – IAA adagolás nélkül is – jelentős hatást gyakorolnak [85]. Egyáltalán nem vizsgált kérdés azonban, mindez hogyan változtatja meg a gazdanövény gyökerének vasháztartását.

3.1.5. A Mössbauer-spektroszkópia alkalmazása a növényi vasfelvétel vizsgálatában

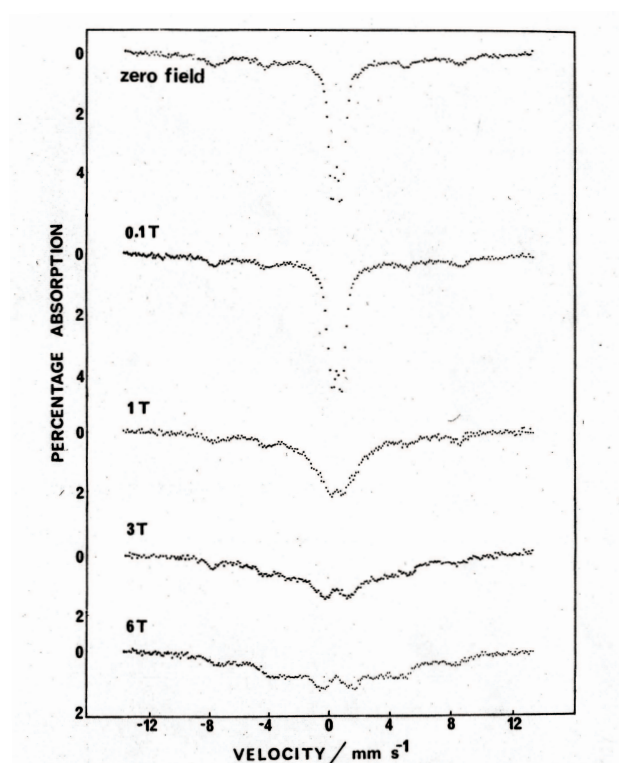
A Mössbauer-spektroszkópiai irodalomban a növényi vasfelvétellel és vasraktározással kapcsolatban az 1980-as évektől kezdve jelentek meg átfogó közlemények. Elsők között említhető Goodman és DeKock munkája [86, 87], akik mind szobahőmérsékletű, mind alacsony hőmérsékletű ⁵⁷Fe Mössbauer-spektrumok segítségével elemezték a békalencsében (*Lemna gibba*), violában (*Matthiola incana*), szójababban (*Glycine soya cv Hawkeye*) és borsóban (*Pisum sativum*) kialakuló vasvegyületeket. A kapott Mössbauer-paraméterek alapján (13. táblázat) megállapítható, hogy a növényekben a vas +3 oxidációs állapotban akkumulálódik (kivéve a borsó levelét, ahol 10 % Fe^{II}-t is találtak). Az alacsony hőmérsékleten végzett Mössbauer-mérések (34. ábra) szerint a Fe^{III}-vegyületek döntő többsége alacsony hőmérsékleten (4,2 K) egy antiferromágneses rendezettséget mutató anyag, míg kb. 15%-a paramágneses állapotú (komplexált) Fe³⁺ formájában van jelen. Az antiferromágneses spektrumjárulékot (a ferritin belsejében biomineralizálódó) ferrihidritként azonosították. A kapott Mössbauer-paramétereket és a hőmérsékletfüggő spektrumokat korábbi irodalmi adatokkal összevetve ez azonban csak úgy lehetséges, ha a vizsgált növényben a ferritin ásványi magjának szemcsemérete kisebb, mint 15 Å.

Egy későbbi munkában Kilcoyne és munkatársai a rizsben raktározódott vasat vizsgálták [88]. A gyökér 80 K-es Mössbauer-spektrumai alapján a szerzők két Fe^{III}-komponenst javasoltak ($\delta = 0,50 \text{ mm s}^{-1}$ $\Delta = 0,40\text{--}0,60 \text{ mm s}^{-1}$, illetve $\delta = 0,50 \text{ mm s}^{-1}$ $\Delta = 1,00\text{--}1,15 \text{ mm s}^{-1}$). Fő vastartalmú komponensként a ferritint azono-

²⁵Egyes tanulmányok szerint a reduktáz aktivitás megváltozása, illetve a savasodás IAA hatására nem számottevő [84].

Minta	A mérés hőmérséklete	δ (mm s ⁻¹)	Δ (mm s ⁻¹)
friss békalencse	77	0,49	0,67
szárított békalencse	77	0,50	0,61
viola, gyökér	77	0,50	0,67
szójabab, levél	77	0,46	0,76
borsó gyökér, szárított	300	0,39	0,71
borsó levél, szárított	300	0,35	0,71
		1,33	2,57

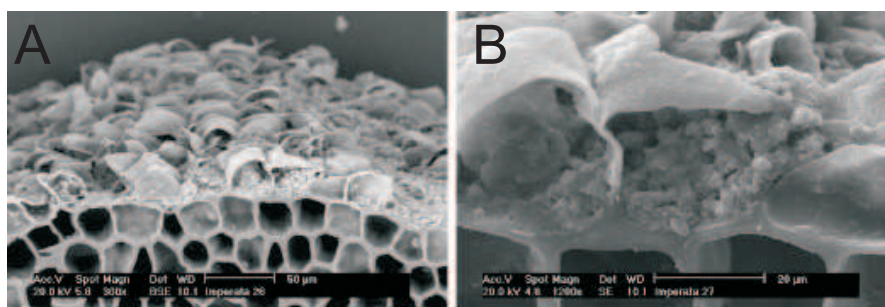
13. táblázat. A vizsgált növényminták Mössbauer paraméterei [86]. Az izomereltolódás értékeit α -Fe-hoz képest adtam meg.



34. ábra. A békalencse Mössbauer-spektrumai 4,2 K-en, külső mágneses tér alkalmazása esetén [87]. A mágneses tér iránya párhuzamos a γ -sugárnyalábbal.

sították, de mellette nem zárták ki – alacsonyhőmérsékletű mérések alapján – szuperparamágneses vas-oxidok, vas-oxi-hidroxidok jelenlétét sem (γ -FeOOH).²⁶ A levelekre kapott eredményeik hasonlóak voltak, azonban az ott raktározott vas jelentős részét paramágneses Fe^{III}-komplexeikként azonosították. Ez a tanulmány +2 oxidációs állapotú vasat nem mutatott ki sem a levélben, sem a gyökerekben (kivéve a toxikusan alacsony pH esetét).

Érdekes eredményt mutat egy spanyol kutatócsoport vizsgálata [89], akik egy erősen savas, fémekkel szennyezett talajon nőtt fűfélélt (*Imperata cylindrica*) tanulmányoztak Mössbauer-spektroszkópia, por-röntgendiffrakció, pásztázó elektronmikroszkóp és röntgenfluoreszcencia segítségével. A gyöktörzsben a ferritin mellett intenzív biomineralizáció következtében kialakult kristályos jarositot ($\text{KFe}_3(\text{OH})_6(\text{SO}_4)_2$) is sikerült kimutatniuk, azonban a spektrumok alapján a vas-kén proteinek jelenléte sem volt kizárható. A ferritinről azonban – az előző irodalmakhoz hasonlóan a hőmérsékletfüggő Mössbauer-spektrumok segítségével – megállapították, hogy csak apró szemcseméretű (kb. 20 Å) formában lehet jelen. Emellett az elektronmikroszkópos felvételek meglepően jól elkülöníthető, µm-es nagyságú kristályos képződményeket mutattak, ahogy ez a 35. ábrán is látható.



35. ábra. SEM felvétel az *Imperata cylindrica* gyökere epidermiszének (A) belső felületéről illetve (B) ennek részlete [89].

A növényi szövetek vizsgálatán kívül természetesen sokkal bővebb irodalma van a Mössbauer-spektroszkópia tágabb értelemben vett növényélettani alkalmazásának, mely az egyes tipikus, élő szervezetben előforduló vasvegyületek szerkezetével foglalkozik. Ezek közül jelen munkában kiemelném a ferritin és a vas-kén proteinek Mössbauer-spektroszkópiás vizsgálatait, melyek a növények Mössbauer-spektrumainak felbontásához nyújtanak támpontot.

A ferritin, ahogy azt a 3.1.2. szakaszban már említettem, az élővilág széles körben elterjedt vasraktározó fehérjéje (33. ábra). Mivel a fehérjeburokban kialakuló, több

²⁶Az oxi-hidroxidok kialakulásában szerepet játszhatott a magas vastartalmú tápoldat alkalmazása, ui. a kísérleti leírás szerint a tápoldatok ⁵⁷FeCl₂-tartalma elérte a 300 mg/l-t, ami többszázszoros túltápláltságot jelent az optimális vaskoncentrációhoz (1,3 mg/l) képest.

ezer vasatomot tartalmazó ferrihidrit szerkezetet mutató ásvány kristályos rendezettsége rendkívül változó (ui. egyes szervesetlen anyagok – pl. foszfát – nagy mennyiségben beépülhetnek a szerkezetbe), Mössbauer-spektrumaik nagy változatosságot mutatnak. Az irodalomban a szobahőmérsékleten mért kvadrupólusfelhasadás nagyságára 0,62 és 0,86 mm s⁻¹ közötti értékeket találunk, mely a ferrihidritben a Fe^{III}-O₆-oktaéderek szimmetriájának torzulását tükrözi [90]. A spektrumok kiértékelése igen nehéz, mert a szimmetrikus dublett vonalszélessége – a több hasonló lokális Fe^{III}-mikrokörnyezet következtében – meglehetősen nagy, a vonal gyakran csak paraméter-eloszlás segítségével illeszthető. A kristályosság fokától függően a ferritin alacsony hőmérsékleten antiferromágneses rendezettséget mutat, mely kb. 10–45 K között alakul ki. A mágneses rendezettség kialakulásánál – kis átmérőjű ferritinek esetén – a szemcseméretből adódó szuperparamágneses viselkedést is figyelembe kell venni. Bonyolultabb a helyzet az amorf szerkezetű ferrihidriteknél, ahol alacsony hőmérsékleten a mágneses momentumok véletlenszerű, nem párhuzamos rendeződését is megfigyelték [48]. Különböző fajok esetén tanulmányozott ferritinek tulajdonságait foglalja össze a 14. táblázat.

A ferritin mellett a másik igen elterjedt, vasat nagy mennyiségben tartalmazó fehérjecsalc a vas-kén proteinek családja. Ezek a fehérjék elektrontranszport-folyamatokban vesznek részt, és az aktív centrumban jelen lévő vas helyzetét az aminosav-láncok konformációja határozza meg. Négyféle vas-kén proteint különböztethetünk meg, ezeknek egy, két, három, illetve négy vasatomot tartalmazó vas-kén

Minta	Az Fe-atomok mennyisége	A mag átlagos mérete (nm)	Kristályos rendezettség	Fe/P _i arány	T _B (K)
Ember	2500	5,5–6,0	kristályos	21	40
Ló	2000	—	kristályos	8	40
(lép)					
Baktérium	1000	—	amorf	1,5–1,9	20
(<i>Azotobacter vinelandii</i>)					
Baktérium	800	6,0–6,5	amorf	1,7	~3
(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)					
Patkány	—	4,1–6,7	kristályos	8	23
(hemosziderin)					
Puhatestű	2500	7,5–8,0	részlegesen kristályos	44	30
(<i>Patella laticostata</i>)					
Puhatestű	1500–2500	8,0–8,5	részlegesen kristályos	36	32
(<i>Acanthopleura hirtosa</i>)					
Borsó	1800	5,2–6,5	amorf	2,8	4,1–90
(<i>Pisum sativum</i> , mag)					

14. táblázat. Különböző fajokban található ferritin vastartalmú ásványi magjának a tulajdonságai [66] alapján. A táblázatban P_i a ferrihidritbe beépült foszfort, T_B a blokkolási hőmérséklet jelenti.

centrumuk lehet. Minden vas-kén centrum jellemzője, hogy négy S-atom által tetraéderezen koordinált Fe-atomot tartalmaz. A növényekben főként a két vascentrumú ferredoxinok fordulnak elő, de a négy vascentrumú fehérjék is jelen vannak a mitokondriumokban és a fotoszintetikus rendszerekben. A két vasat tartalmazó oxidált állapotú ferredoxinok jellemzője a viszonylag alacsony $0,22 \text{ mm s}^{-1}$ izomereltolódású és egy $0,59 \text{ mm s}^{-1}$ körüli kvadrupólusfelhasadású dublett (195 K hőmérsékleten) [91]. Redukált esetben két dublettet kapunk (Fe^{II} és Fe^{III}), ami egy egyelektron-felvételt jelent, és a felvett elektron az egyik vasatomon lokalizálva helyezkedik el. Az Fe^{II} paramétereire $\delta = 0,56 \text{ mm s}^{-1}$, illetve $\Delta = 2,75 \text{ mm s}^{-1}$ értékek adódnak. A négy vascentrum esetén – az előzőektől eltérően – nem beszélhetünk az elektronok adott vasatomon történő lokalizációjáról, hanem egy átlagos oxidációs állapotot adhatunk meg. Az izomereltolódások $0,33\text{--}0,56 \text{ mm s}^{-1}$, a kvadrupólusfelhasadások $0,77\text{--}1,15 \text{ mm s}^{-1}$ között változhatnak²⁷ ($\text{Fe}^{2,25+}$, $\text{Fe}^{2,5+}$, $\text{Fe}^{2,75+}$) [91–94].

3.2. Kutatási célok

Munkám során az ELTE Növényélettani Tanszékével együttműködésben a régóta alkalmazott növényfiziológiai kísérleti eljárásokat a ^{57}Fe Mössbauer-spektroszkópia által nyújtott lehetőségekkel kombinálva vizsgáltam a növények vasszorbó felvételi mechanizmusait és a vas gyökérbeli raktározási formáit. A kutatáshoz két növényt használtam: (i) uborka (*Cucumis sativus*), mely vasszorbó felvételét tekintve az I. stratégiát követi és (ii) búza (*Triticum aestivum*), mely a II. stratégia képviselője.

A kutatás során a következő fő kérdésekre kerestem a választ:

1. Megfelelő mennyiségű vasellátottság mellett milyen vegyületek formájában fordul elő a vas az uborka és a búza gyökérében?
2. Hogyan tükröződik a kétféle vasszorbó felvételi mechanizmus az uborka és a búza gyökérében lévő vasvegyületeken keresztül?
3. Milyen változásokat okoz a vasszorbó felvétel mechanizmusában és a gyökérben jelen lévő vasvegyületek előfordulásában a kadmium jelenléte uborka esetén?

3.3. Kísérleti eljárások

3.3.1. Az uborka és búza növények nevelése

Az uborka és búza növényeket vízkultúrában, módosított Hoagland-tápoldaton neveltem (36. ábra). A tápoldatban pufferoldatot nem alkalmaztam, az oldat a következő

²⁷Az elektrontranszport-rendszerek másik jelentős képviselői, a citokrómok, melyek a vasat hemcsoportban tartalmazzák, szintén a megadott Mössbauer-paraméterekkel jelennek meg a spektrumokban (kisspinű Fe^{2+} -hem), ami szeparációjukat Mössbauer-paramétereik alapján nehezíti [94].



36. ábra. Az uborka növények nevelése műanyag pohárban, fitotron kamrában (ELTE Növényélettani Tanszék).

makro- és mikroelemeket tartalmazta: 1,25 mM KNO_3 , 1,25 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,5 mM MgSO_4 , 0,25 mM $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, 11,6 μM H_3BO_3 , 4,5 μM MnCl_2 , 0,19 μM ZnSO_4 , 0,12 μM Na_2MoO_4 , 0,08 μM CuSO_4 . Vassal ellátott növények esetén 10 μM $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrátot is adtam a tápoldathoz. Minden növényt egy 400 cm³-es műanyag pohárban neveltem, a tápoldatot minden második nap cseréltem, a vizsgálatokhoz 16–20 napos növényeket használtam. A friss tápoldat pH-ja a vas-citrát hozzáadása előtt 4,4, a vas-citrát hozzáadása után 4,9 volt. A pH a nevelés során a gyökérben lejátszódó élettani folyamatok miatt jelentősen változott: feldolgozás előtt (mely az oldatcsere után egy nappal történt) a vasat is tartalmazó minták pH-ja 5,9, míg a vashiányos minták pH-ja 3,7 volt. A vashiányosan nevelt növényeket 16–18 nap nevelés után 500 μM koncentrációjú $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát tartalmú tápoldatba helyeztem különböző ideig (30, 60, 90, 180 perc és 1 nap), illetve különböző koncentrációjú (10, 50, 100, 500 μM) $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát tartalmú tápoldatokba 30 percig. A vas mennyiségi analíziséhez, illetve a vas-kelát reduktáz aktivitás méréshez a kereskedelembe kapható természetes izotópösszetételű Fe^{III} -citrátot használtam fel.

A nehézfém-szennyezés hatásait uborka növényekben vizsgáltam. Ehhez szintén Hoagland-tápoldatot alkalmaztam, 10⁻⁵ M $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ adagolása mellett. A nehézfémet a nevelés teljes időtartama alatt folyamatosan adagoltam a 10 μM $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citráttal párhuzamosan. A Cd-szennyezés hatását vashiányos növények esetén is tanulmányoztam: vashiányosan nevelt növényeket 3 órára különböző koncentrációjú $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -ot (0,1; 1; 10; 100 μM) tartalmazó tápoldatokba helyeztem, majd 30 percen keresztül

500 μM $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citráttal is elláttam a mintákat (a $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ a vasellátás során is jelen volt).

Az IAA vasfelvételre gyakorolt hatásait búza növényeken vizsgáltam.²⁸ Kereskedelmi forgalomban kapható IAA-ból sztöchiometrikus mennyiségű KOH hozzáadásával készítettem oldatot, majd ebből – a korábbi irodalmak alapján [85] – egy magas IAA tartalmú 10^{-4} M-os, és egy alacsony IAA tartalmú 10^{-9} M-os Hoagland-oldatot állítottam elő. Emellett egy kontroll búzát is neveltem, IAA felhasználása nélkül.

3.3.2. Mössbauer-analízis

A Mössbauer-spektroszkópia rövid ismertetése és a spektrumok kiértékelésére vonatkozó információk a 2.3.1. fejezetben találhatók, jelen szakaszban a növényi minták esetén alkalmazott kísérleti eljárás specifikus részleteit ismertetem. A növényminták vizsgálata előtt felvettem a neveléshez frissen készített $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát oldatok Mössbauer-spektrumait 80 K-en. A növények ^{57}Fe transzmissziós Mössbauer-spektrumainak felvételéhez a gyökereket a tápoldatból eltávolítottam, desztillált vízzel öblítettem, szűrőpapírral leitattam, majd folyékony nitrogén segítségével megfagyasztottam. Ezután a gyökereket 80 K hőmérsékleten tároltam, hogy a feldolgozás utáni változásokat minimálisra csökkentsem. A spektrumokat 80 K hőmérsékleten vettem fel.

Végeztem alacsony hőmérsékletű méréseket (1,5 K–12 K) is, külső mágneses tér nélkül és annak jelenlétében.²⁹ Ezeknél – mérés technikai okokból – a mintákat fagyasztva szárítottam (liofilizáltam), majd elporítottam. A Mössbauer-mérésekhez az így kapott pormintát használtam fel.

3.3.3. A gyökér vas- és kadmiumtartalmának meghatározása

A vas és a kadmium mennyiségi analízisét induktív csatolású plazma tömegspektrometria (ICP-MS) segítségével, az ELTE Analitikai Tanszékén Tatár Enikővel és a Debreceni Egyetem Botanikai Tanszékén Lévai Lászlóval együttműködésben végeztük. Az eljárás során ICP segítségével ionizáltuk a feltárt mintát, majd a tömegspektrométerben az egyes elemek mennyiségét egy belső standardhoz képest határoztuk meg. A gyökerek vastartalmának méréséhez természetes izotópösszetételű Fe^{III} -citráton nevelt növényeket használtunk fel. A tápoldatból történő eltávolítás után a gyökereket szűrőpapírral leitattuk, tömegállandóságig 80 °C-on szárítottuk, majd a száraz szövetet kvarc bombában salétromsav segítségével feltártuk.

²⁸Azért összpontosítottam a II. stratégiai csoportba tartozó növényekre, mert a számunkra elérhető IAA-t termelő baktériumtörzsek (*Azospirillum sp.*) búza növények gyökereit kolonizálják. Az IAA oldattal elvégzett kísérlet további, baktériumokkal tervezett munka előkísérlete volt.

²⁹Ez utóbbi méréseket Jean-Marc Greneche laboratóriumában, a Le mans-i egyetemen, illetve Libor Machala közreműködésével az olomouci egyetemen végeztem.

A gyökerek szimplasztjának vastartalmát az apoplasztban kötött vas eltávolítása után határoztuk meg. Az apoplaszt mosásához Bienfait módszerét használtuk fel [54]. Az eljárás során a mintákat 1,5 mM 2,2'-bipiridilt (bipy) tartalmazó oldatban inkubáltuk 10 percen keresztül, 5 mM Na₂S₂O₄ jelenlétében, nitrogén atmoszférában. A redukív környezet hatására az apoplasztban gyengén kötött vas redukálódik és [Fe^{II}(bipy)₃]⁴⁻ komplex formájában oldatba kerül. A szöveten szemmel láthatóan kevés mennyiségű komplex adszorbeálódik, ui. az említett komplex jellegzetes piros színe csak enyhén festi meg a gyökeret, azonban gyökéren maradó Fe^{II}-bipy komplex és az apoplasztban esetlegesen kötött formában megmaradó Fe^{III} mennyiségére nincsenek analitikai adatok. Fontos kiemelni, hogy ezen eljárás során a citoplazma membránja Bienfait és munkatársai mérései alapján nem sérül meg, továbbá sem a redukálószerként alkalmazott ditionit, sem a komplexképző 2,2'-bipiridil nem jut át a membránon. A kezelés után a szövetet 0,5 mM-os CaSO₄ oldatban leöblítettük, szűrőpapírral leitattuk, majd tömegállandóságig szárítottuk.

A kadmium mennyiségének meghatározása a vassal azonos módon történt. Ebben az esetben azonban a Bienfait eljárással – bizonyító adatok hiánya miatt – nem különíthetjük el az apoplaszt és a szimplaszt Cd-tartalmát, ezért csak a gyökér teljes Cd-mennyiségét mértük meg.

3.3.4. A vas-kelát reduktáz aktivitás mérése

A vas redukciójáért felelős vas-kelát reduktáz enzim működésének jellemzésére Zouari [95] és Gogorcena [96] dolgozott ki széles körben használt eljárást, melynek alapján az időegység alatt gyökéren redukálódott vasmennyiséget egy reagens oldat segítségével mértem. A növények gyökereit 0,5 mM-os CaSO₄ oldatban leöblítettem, majd 15 percig a reagens oldatba (500 μM Fe^{III}-EDTA, 400 μM batofenantrolin-diszulfonát (BPDS), 5 mM 2-(*N*-morfolino)-etánszulfonsav (MES), 2,5 mM KNO₃, 2,5 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM MgSO₄, 0,5mM K₂H₂PO₄, pH=6) helyeztem, és sötétben rázógépen rázattam. Az inkubáció után az oldatok abszorbanciáját 535 nm-es hullámhosszon megmértem. A felhasznált gyökerek tömegét mind friss, mind szárított állapotban meghatároztam, majd az adatokból a [Fe^{II}(BPDS)₃]⁴⁻ komplex extinkciós koefficiense (22,14 mM⁻¹ cm⁻¹) felhasználásával az egységnyi időre és gyökértömegre eső redukált vasmennyiséget kiszámítottam.

3.3.5. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok

A transzmissziós elektronmikroszkóp (transmission electron microscope, TEM) elvi felépítésében a hagyományos, optikai mikroszkóphoz hasonlít. TEM esetén azonban a látható fény helyett 80–3000 keV energiájú elektronokkal világítjuk át a mintát. Ennek

megfelelően a fókuszálás elektromágneses lencsékkel történik, a detektálást általában fluoreszcens képernyő végzi. A módszer segítségével a kristályos anyagok atomi szerkezetét le lehet képezni, illetve ezen anyagok jelenlétét a szövetben (sejtekben) ki lehet mutatni.

Az elegendő vasellátás mellett nevelt uborka gyökerét transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével, Bóka Károly együttműködésével, Hitachi 7100 TEM típusú készülékkel vizsgáltuk. A vizsgált sejtek a gyökér központi szállítóeleme melletti szövetből származtak. A minták rögzítése glutáraldehid és ozmium-tetraoxid oldatok felhasználásával történt, majd a metszetek (60 nm) készítéséhez a kezelt szövetet Durcupan gyantába ágyasztuk.

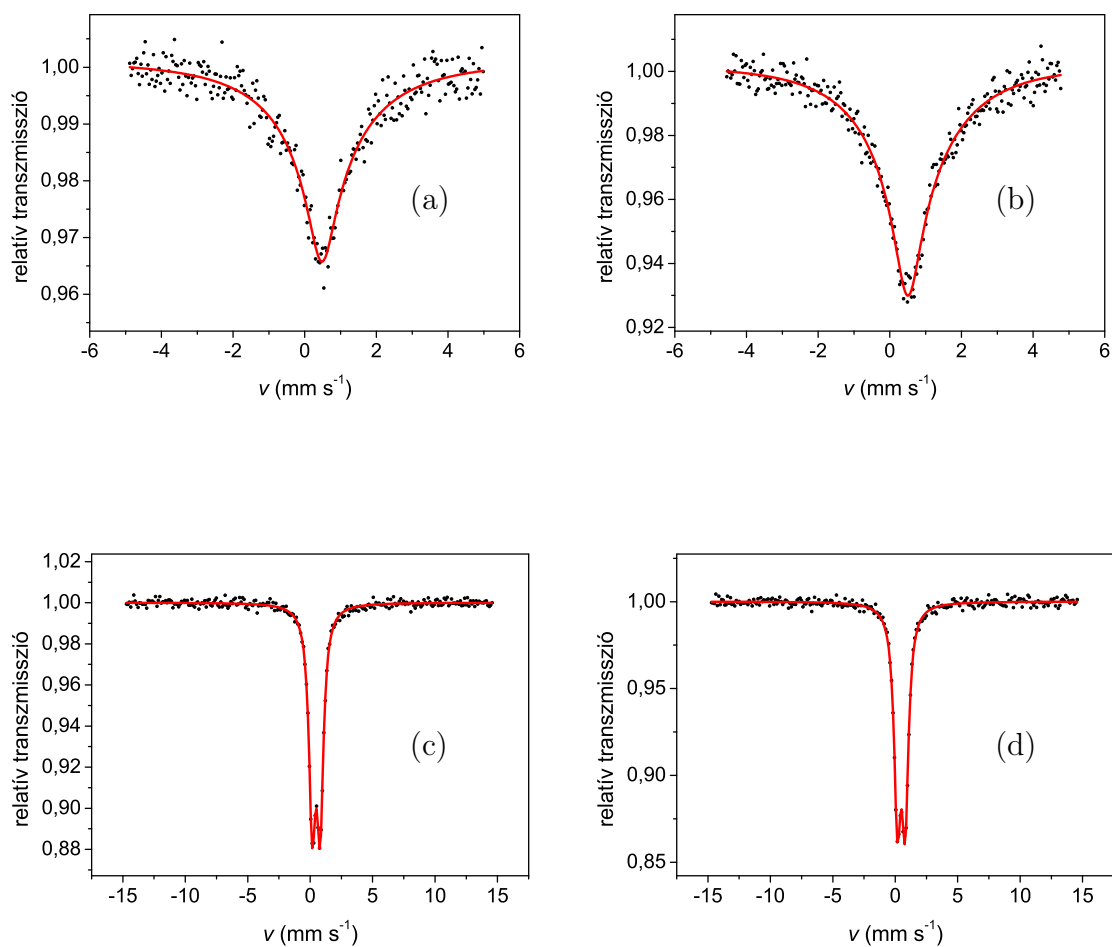
3.4. Kísérleti eredmények és értékelésük

3.4.1. A növények neveléséhez felhasznált $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát oldatok vizsgálata

A növényekbe felvett vas vizsgálatához szükségesnek bizonyult a kiindulási $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát Mössbauer-paramétereinek megállapítása, mivel a jelen munka során alkalmazott 1:1,1 Fe:citromsav arányú $^{57}\text{FeCl}_3$ -citromsav elegyre nem találhatók irodalmi adatok. A szilárd, kereskedelmi forgalomban kapható Fe^{III} -citrát Mössbauer-paramétereit egy 1970-es munka szerint $\delta = 0,523 \text{ mm s}^{-1}$ és $\Delta = 0,612 \text{ mm s}^{-1}$ -nak adódtak [97].

Az általam felhasznált $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát oldatok pH értékei tág tartományon belül változtak, a $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -hoz hozzáadott citromsav mennyiségétől és a növények nevelési körülményeitől függően. A vas-citrát előállításához kiindulási oldatként 0,1 M-os $^{57}\text{FeCl}_3$ -oldatot alkalmaztam, melynek pH értéke 1,3 volt. Ehhez 10 % feleslegben adtam citromsav-oldatot, mely a pH-t 1,1-re változtatta. Mivel a tápoldatok pH-ja a vas-koncentrációtól és nevelési időtől függően 4,0–6,0 között volt (3.3.1. fejezet), munkám során felvettem KOH segítségével készített 4-es és 6-os pH-jú $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát oldatok Mössbauer-spektrumait is. A spektrumok a 37. ábrán, a Mössbauer-paraméterek a 15. táblázatban láthatók.

A $^{57}\text{FeCl}_3$ oldat spektruma a korábban bemutatott $^{57}\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ oldathoz hasonlóan (2.4.1. fejezet) egy széles, mágneses relaxációt mutató spektrumvonalat ad. Ez – a híg Fe^{3+} oldatokra jellemző – lassú paramágneses spinrelaxáció következménye, ami monomer formájú Fe^{3+} jelenlétét mutatja, melyhez a Cl^- -ionok és H_2O -molekulák változó arányban koordinálódhatnak. A citromsav hozzáadása szemmel láthatóan nem változtatja meg a Mössbauer-spektrumot (37. (b) ábra), ami továbbra is monomer formájú Fe^{3+} részecskék jelenlétét tükrözi. A pH emelése azonban változást eredményez, ahogy ezt a 4-es és 6-os pH-jú oldatok Mössbauer-spektrumán jelentkező dublett mutatja (37. (c, d) ábra). A dublett komponens a Fe^{3+} dimerizálódásával magyarázható, azaz



37. ábra. (a) A kiindulási 0,1 M $^{57}\text{FeCl}_3$, (b, c, d) és a belőle készített 0,05 M $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát oldatok Mössbauer-spektrumai 80 K hőmérsékleten. A $^{57}\text{FeCl}_3$ oldat pH-ja (a) 1,3; a $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát oldatok pH-ja (b) 1,2; (c) 4,0 és (d) 5,9 voltak.

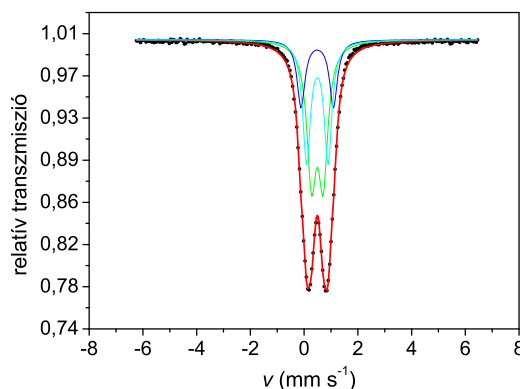
minta	komponens	δ (mm s $^{-1}$)	Δ (mm s $^{-1}$)	Γ (mm s $^{-1}$)	S (%)
0,1 M $^{57}\text{FeCl}_3$ pH = 1,3	mágneses r.	0,53(5)	—	0,75(6)	100
0,05 M $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát pH = 1,2	mágneses r.	0,55(3)	—	0,78(7)	100
0,05 M $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát pH = 4,0	Fe^{3+} dimer	0,484(3)	0,625(4)	0,65(1)	100
0,05 M $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát pH = 5,9	Fe^{3+} dimer	0,481(3)	0,639(4)	0,64(1)	100

15. táblázat. 10^{-5} M $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát mellett nevelt uborka gyökér 80 K-en mért Mössbauer-spektrumának paraméterei.

dimer szerkezetű $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát komplex kialakulásával magyarázható (hidroxid csapadék nem képződik). A komplex szerkezete valószínűleg – analitikai számításokat is figyelembe véve – $[\text{Fe}_2\text{Cit}_2(\text{OH})_2]^{2-}$ összegképlettel írható le [62]. A Mössbauer-spektrumok alapján tehát $\text{pH} = 4\text{--}6$ között az oldatban lévő összes vas dimer formájú citrát komplexbe kerül. Ez egyben – a tápoldatok pH -ját figyelembe véve – azt is mutatja, hogy a növények nevelése során alkalmazott Hoagland-tápoldatokban a vas Fe^{III} -citrát komplex formájában van jelen.³⁰ Megjegyzendő azonban, hogy a vonalszélesség mindkét dimer esetén viszonylag nagy, ami több, hasonló koordinációjú komplex együttes jelenlétére utalhat. Ez utóbbi jelenség a Fe^{III} -citrát komplex viszonylag kis stabilitásával magyarázható (lásd 12. táblázat).

3.4.2. Optimális vasellátás mellett nevelt uborka és búza növények gyökerének vizsgálata

Az elegendő vasellátás (10^{-5} M Fe^{III} -citrát) mellett nevelt uborka (I. vASFelvételi stratégia) gyökerének 80 K-en felvett Mössbauer-spektruma a 38. ábrán látható.



38. ábra. 10^{-5} M $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát mellett nevelt uborka gyökerének Mössbauer-spektruma 80 K hőmérsékleten, három alspektrumra bontva.

A spektrum egy széles, szimmetrikus dublettet ad, mely egy Lorentz-görbével nem illeszthető. Ez a gyökérben a vASFelvétel és raktározás során kialakuló, többféle Fe-vegyület jelenlétére utal. A Mössbauer-irodalomban ezidáig megjelent növényélettani tárgyú közlemények alapján [86–89] a 80 K-en kapott dublettet három komponensre bontottam fel, mely – a Mössbauer-paramétereket figyelembe véve (16. táblázat) – három fő vas(III) vegyülettípusnak feleltethető meg ($\text{Fe}_\text{A}^{\text{III}}$, $\text{Fe}_\text{B}^{\text{III}}$, $\text{Fe}_\text{C}^{\text{III}}$). A $\text{Fe}_\text{A}^{\text{III}}$ oktaéderes

³⁰A tápoldatok alacsony vastartalma (10^{-5} M) befolyásolhatja a monomer-dimer egyensúlyt, tehát elképzelhető hogy az említett oldatokban monomer formájú Fe^{III} -citrát részecskék is előfordulnak, pl. FeCit_3 , $\text{Fe}[\text{CitOH}]^-$.

komponens	δ (mm s ⁻¹)	Δ (mm s ⁻¹)	Γ (mm s ⁻¹)	S (%)
Fe _A ^{III}	0,503(1)	0,44(2)	0,40(1)	44
Fe _B ^{III}	0,502(1)	0,80(2)	0,35(1)	35
Fe _C ^{III}	0,497(2)	1,22(2)	0,36(1)	21

16. táblázat. 10⁻⁵ M ⁵⁷Fe^{III}-citrát mellett nevelt uborka gyökér 80 K-en mért Mössbauer-spektrumának paraméterei.

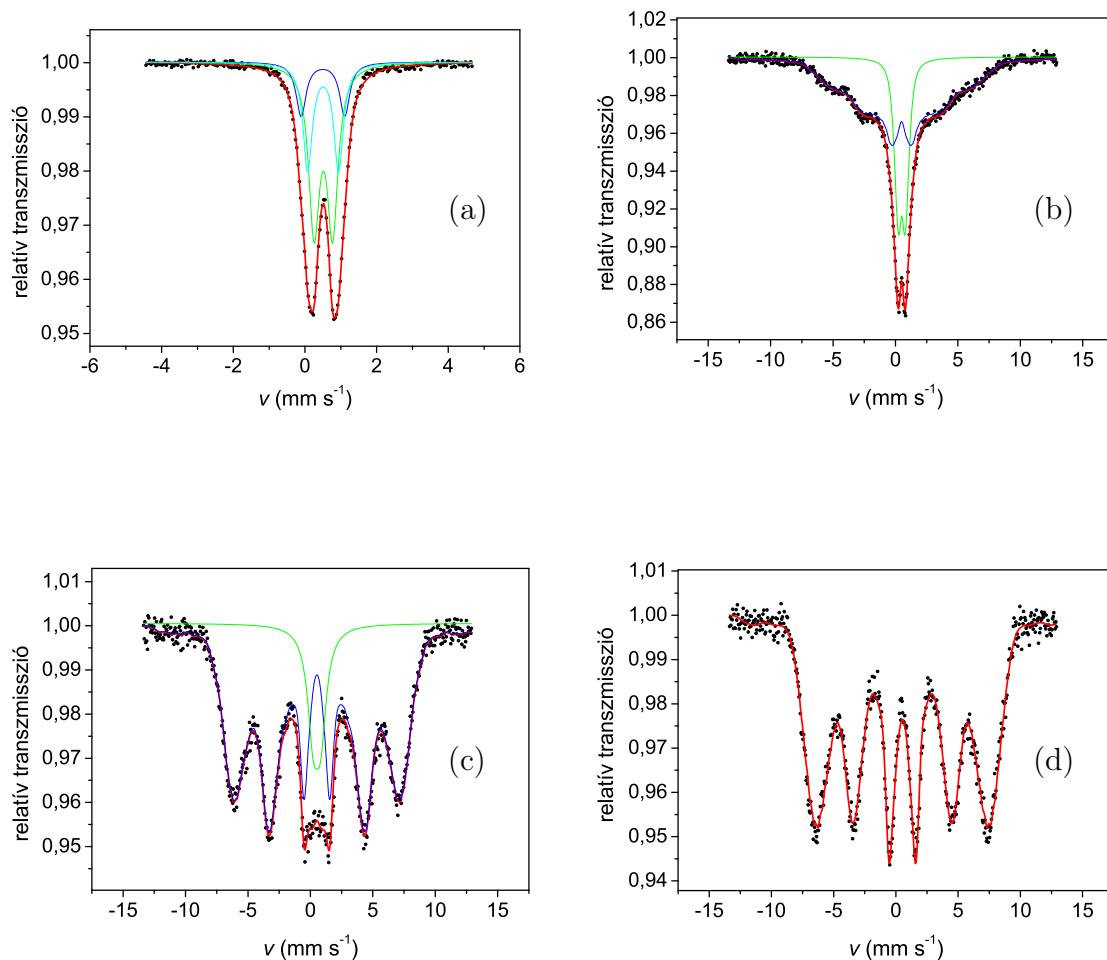
O₆ koordinációjú, nagyspinű Fe^{III}-komplexekhez rendelhető, melyek főként a sejt citoplazmájában lévő szerves savak által képzett Fe^{III}-karboxilátok lehetnek. Hasonló paramétereket adhat azonban a sejtfal szabad karboxilát csoportjain megkötött Fe^{III} (Fe^{III}-pektátok), illetve a sejtfalon lévő kiindulási tápoldatból származó Fe^{III}-citrát-komplex is. A Fe_B^{III} komponens Mössbauer-paraméterei jó egyezést mutatnak a ferrihidrit paramétereivel, illetve a Mössbauer-irodalomban eddig mért növényi ferritin paramétereivel. A harmadik, Fe_C^{III} komponens karakterisztikus Mössbauer-paraméterei alapján Fe^{III}-szulfát-hidroxidoknak, azaz különböző összetételű jarozitoknak MFe₃(OH)₆(SO₄)₂, ahol M⁺ = H₃O⁺, K⁺, NH₄⁺, ..., feleltethető meg [98].

A minták alacsony hőmérsékleten (4,2 és 1,5 K-en), külső mágneses tér nélkül és annak jelenlétében (5 T) felvett Mössbauer-spektrumai megerősítik a 80 K hőmérsékleten mért Mössbauer-spektrumok fent bemutatott felbontását. Az uborka liofilizált³¹ gyökeréről 80 K, 4,2 K illetve 1,5 K hőmérsékleten készült Mössbauer-spektrumokat a 39. ábra mutatja.

Szembetűnő változás a 80 K-es Mössbauer-spektrumhoz képest a 4,2 K-en kialakuló, mágneses felhasadást mutató spektrumjárulék megjelenése a paramágneses dublett komponens mellett. 1,5 K-re csökkentve a hőmérsékletet, a szextett komponens területaránya a széles dublett komponenshez képest növekedést mutat, és a mágneses felhasadás nagysága is nő. A külső mágneses tér jelenlétében felvett spektrumon látható, hogy nem tartalmaz dublett alspektrumot. A mágneses hiperfinom szerkezetet mutató spektrumkomponensek illesztéséhez mindhárom esetben mágnesesindukció-eloszlást alkalmaztam. A dublettek Mössbauer-paraméterei $\delta = 0,5$ mm s⁻¹, $\Delta = 0,6$ mm s⁻¹-nak adódtak.

A külső mágneses tér nélkül 4,2 K-en és 1,5 K-en megjelenő széles, mágneses felhasadást mutató spektrumjárulékok valószínűleg a különböző mágneses átmeneti hőmérséklettel rendelkező jarozittól és ferrihidrittől származnak (Fe_C^{III}, Fe_B^{III} komponensek). A mágneses rendezettség kialakulását erősen befolyásolja mindkét vegyület esetében

³¹A külföldi együttműködő partnereknél történő Mössbauer-mérések esetében technikai okokból csak liofilizált mintákat tudtam mérni. A liofilizálás előzetes Mössbauer-vizsgálatok alapján nem okoz számottevő változást, amint ezt a 80 K-en, liofilizálás előtt és után felvett Mössbauer-spektrumok összehasonlítása mutatja (38. és 39. (a) ábrák).



39. ábra. 10^{-5} M $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát mellett nevelt, majd liofilizált uborka gyökér Mössbauer-spektrumai: (a) 80 K hőmérsékleten, (b) 4,2 K hőmérsékleten, (c) 1,5 K hőmérsékleten (d) 1,5 K hőmérsékleten és 5 T külső mágneses térben.

azok sztöchiometriai összetétele [99,100]. Különböző ferritinek esetén a ferritin ásványi magjában kialakuló ferrihidritbe beépülő foszfát mennyisége a meghatározó: a Fe/P arány csökkenésével a ferrihidrit kristályossági foka, és vele párhuzamosan a mágneses rendeződés hőmérséklete is csökken (3.1.5. fejezet). A foszfát beépülése mellett más ionok (szulfát, citrát) is erősen befolyásolhatják a ferrihidrit szerkezetét, ahogy ezt szintetikus előállított ferrihidritek vizsgálata alapján megmutatták [48]. A jaroitok esetén $(\text{MFe}_3(\text{OH})_6(\text{SO}_4)_2)$, ahol $\text{M}^+ = \text{H}_3\text{O}^+, \text{K}^+, \text{NH}_4^+, \dots$ a mágneses rendezettség kialakulásának hőmérsékletét elsősorban az M^+ kation befolyásolja. Emellett mesterségesen előállított jaroitokban kimutatták, hogy az oxóniumionok beépülése teljesen megváltoztatja a Fe^{3+} -ionok közötti kölcsönhatást, ami az antiferromágneses rendezettség helyett a mágneses momentumok véletlenszerű elrendeződését okozza [100]. Irodalmi adatok találhatók olyan, alacsony kristályossági fokú Fe^{III} -oxi-hidroxidokra

is, ahol a szerkezetbe beépülő SO_4^{2-} ionok gátolták a mágneses rendezettség kialakulását [101].

A fenti, két spektrumkomponensen alapuló értelmezés mellett nem zárható ki az sem, hogy megfigyelt viselkedést egyfajta, de különböző szemcseméretű szuperparamágneses vegyület okozza. Emellett szól az, hogy a növényi ferritinek esetén kimutatták a ferrihidrit szuperparamágneses viselkedését [66, 87]. A ferritin ásványi magjában a Fe-klaszterek mérete – mely függ a szerkezetbe beépülő egyéb ionok mennyiségétől – okozhatja a mágneses felhasadást mutató spektrumjárulékok különböző hőmérsékleten tapasztalt megjelenését.

A 4,2 és 1,5 K-en felvett Mössbauer-spektrumokban jelen lévő, majd külső mágneses tér hatására eltűnő dublett komponens a paramágneses Fe^{III} -komplexeiktől származhat ($\text{Fe}_\text{A}^{\text{III}}$). Ez tehát az apoplaszt pórusos szerkezetében, illetve a szimplasztban kialakuló Fe^{III} -karboxilátok jelenlétét támasztja alá. Növényélettani megfigyelések, melyek egyes szerves savak (főként citromsav) gyökérben történő szintézisét mutatták ki, szintén megerősítik ez utóbbi komponens képződését.

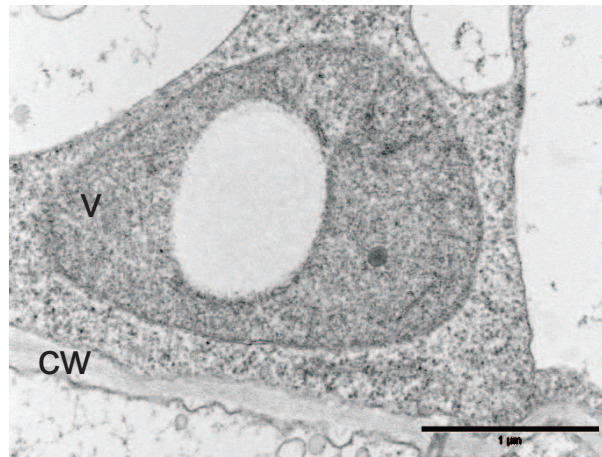
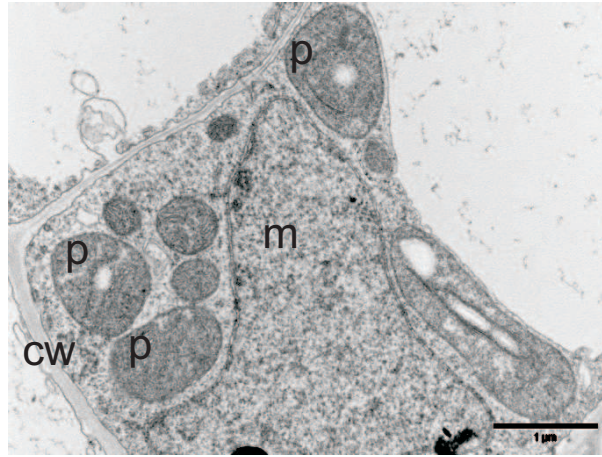
A membránban jelen lévő, elektrontranszport-láncban részt vevő, vastartalmú proteinek (pl vas-kén proteinek, hem-tartalmú proteinek) járulékát, melyek mennyisége a kialakuló ferrihidrithez, karboxilátokhoz és vas-szulfát-hidroxidokhoz képest feltehetően jóval kisebb, Mössbauer-spektroszkópia segítségével nem tudtam kimutatni.

Az uborka gyökeréből származó transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek alapján jól kristályosodott, nagy szemcseméretű vasvegyületek jelenléte szintén nem valószínűsíthető. Két különböző, a gyökér szállítóelemei mellől származó sejtrészlet képét a 40. ábra mutatja. Nagyobb méretű vastartalmú aggregátumok ezek alapján sem a sejtmembrán mellett, sem a vakuólumokban, sem a plasztiszokban nem láthatók.

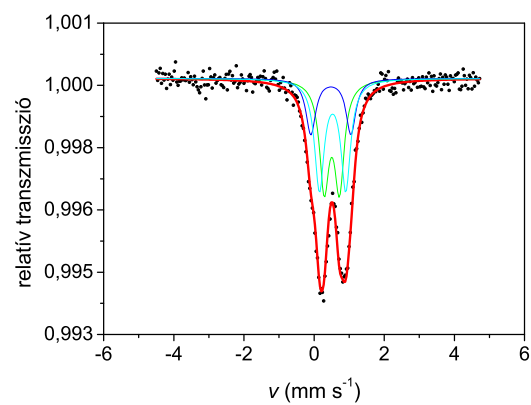
Az uborka növényekkel azonos módon nevelt búza (II. vasfelvételi stratégia) növények gyökerének 80 K-en felvett Mössbauer-spektruma a 41. ábrán látható. A spektrum az uborkagyökér spektrumához hasonlóan bontható fel, a Mössbauer-paramétereket a 17. táblázat tartalmazza.

komponens	δ (mm s ⁻¹)	Δ (mm s ⁻¹)	Γ (mm s ⁻¹)	S (%)
$\text{Fe}_\text{A}^{\text{III}}$	0,50(1)	0,40(4)	0,29(4)	28
$\text{Fe}_\text{B}^{\text{III}}$	0,53(1)	0,73(4)	0,35(5)	51
$\text{Fe}_\text{C}^{\text{III}}$	0,48(1)	1,14(4)	0,32(5)	21

17. táblázat. 10^{-5} M $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát mellett nevelt búza gyökér 80 K-en mért Mössbauer-spektrumának paraméterei.



40. ábra. 10^{-5} M $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát mellett nevelt uborka gyökeréből származó sejtrészletek transzmissziós elektronmikroszkópos felvételei (p-plasztisz, v-vakuólum, cw-sejtfal, m-sejtmag)



41. ábra. 10^{-5} M $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát mellett nevelt búza gyökerének Mössbauer-spektruma 80 K hőmérsékleten, három alspektrumra bontva.

Méréseim alapján a búza gyökerében található vas az uborka gyökerében azonosított Fe^{III} -vegyületeknek feleltethető meg, és eltérő vasszorbóvíteli mechanizmusa ellenére sem mutat számottevő különbséget.

Vizsgálataim alapján összegzésként elmondható, hogy a növények gyökerébe beépülő vas minden esetben három fő, kizárólag +3 oxidációs állapotú vasvegyületként akkumulálódik. Jelentős része változó összetételű ferrihidriteket képez, melyek közül a kis szemcseméretű, magas foszfáttartalmú ferrihidrit kialakulása a legvalószínűbb. A gyökérben a másik fő komponens a Fe^{III} -karboxilátokhoz és Fe^{III} -pektátokhoz rendelhető, kisebb mennyiségben különböző sztöchiometriai összetételű vas-szulfát-hidroxidok is képződnek.

A Fe^{III} -karboxilátok egyrészt a sejten belül, szerves savakhoz kapcsolódva (Fe^{III} -citrát), másrészt az apoplasztban a szabad karboxilát oldalláncokhoz kapcsolódva (Fe^{III} -pektátok) fordulhatnak elő. A ferrihidrit a sejten kívül az apoplasztban és a sejten belül a szimplasztban is előfordulhat, utóbbi esetben ferritin formájában képződhet. A vas-szulfát-hidroxid komponens képződése – a képződéshez szükséges savas környezet és magas szulfáttartalom miatt – az apoplasztban valószínűsíthető. A komponensek elhelyezkedésére vonatkozó feltevéseket az analitikai adatok megerősítik, ugyanis ezek alapján megfelelő (Fe^{III} -citrát) vasellátás mellett nevelt növények gyökerében a vas jelentős része az apoplasztban halmozódik fel [76]. A két különböző vasszorbóvíteli stratégiát követő növény esetén – a vasszorbóvíteli eltérő mechanizmusa ellenére – a gyökérben előforduló vas(III)vegyületekben nem mutatható ki jelentős eltérés. Ez alapján feltételezhető, hogy a különböző vasvegyületek kialakulását inkább a tápoldat pH-ja, valamint a vasszorbóvíteli során alkalmazott Fe^{III} -komplex stabilitása, illetve egyéb ionok jelenléte befolyásolja.

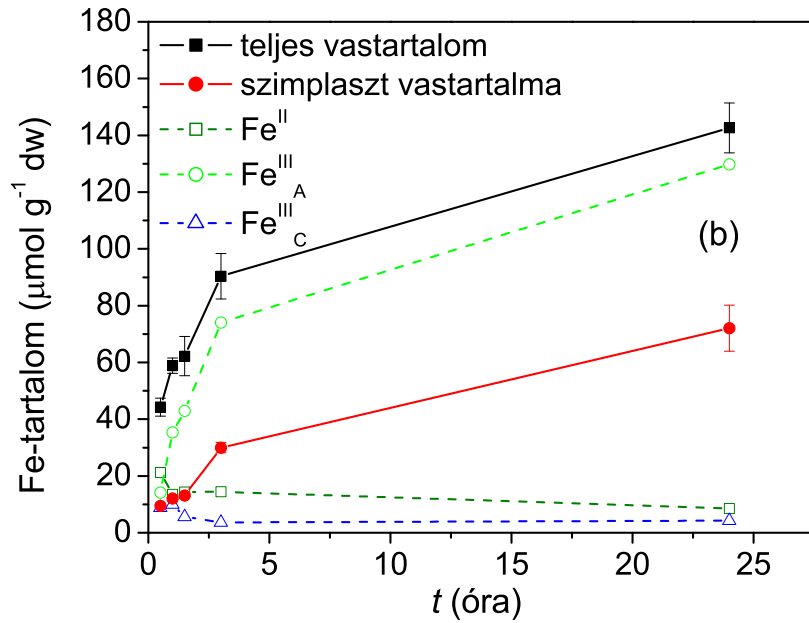
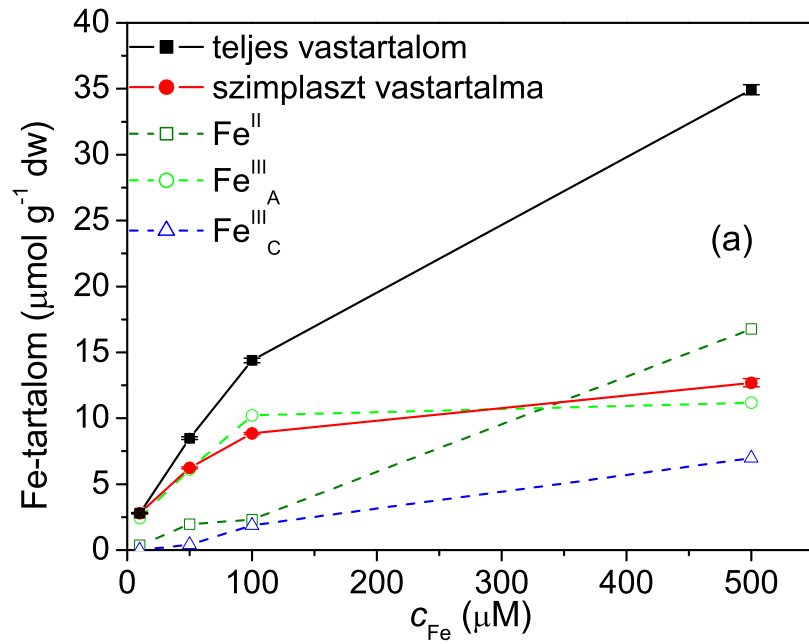
3.4.3. Vashiányos körülmények között nevelt uborka és búza növények gyökerének vizsgálata

A vashiányos tápoldatban nevelt, majd adott koncentrációban (500 μM) különböző ideig, illetve adott ideig (30 perc), de különböző koncentrációban Fe^{III} -citráttal ellátott uborka növények összes és szimplasztbeli vastartalmát mutatja a 42. ábra.

Vassal megfelelő mennyiségben ellátott növényekben a gyökér összvastartalma analitikai mérések alapján 40–50 $\mu\text{mol Fe g}^{-1} \text{ dw}$ (dry weight, száraztömeg egység)³². A vashiányosan nevelt, majd vassal különböző koncentrációban ellátott növényekben az összes vasmennyiség a vasellátás koncentrációjával párhuzamosan erőteljes növekedést mutat (42 (a). ábra).³³ A Bienfait-eljárás segítségével mosott gyökerek mennyiségi analízise

³²A gyökerek száraztömege $\sim 2,5\text{--}5\%$ -a frisstömegnek.

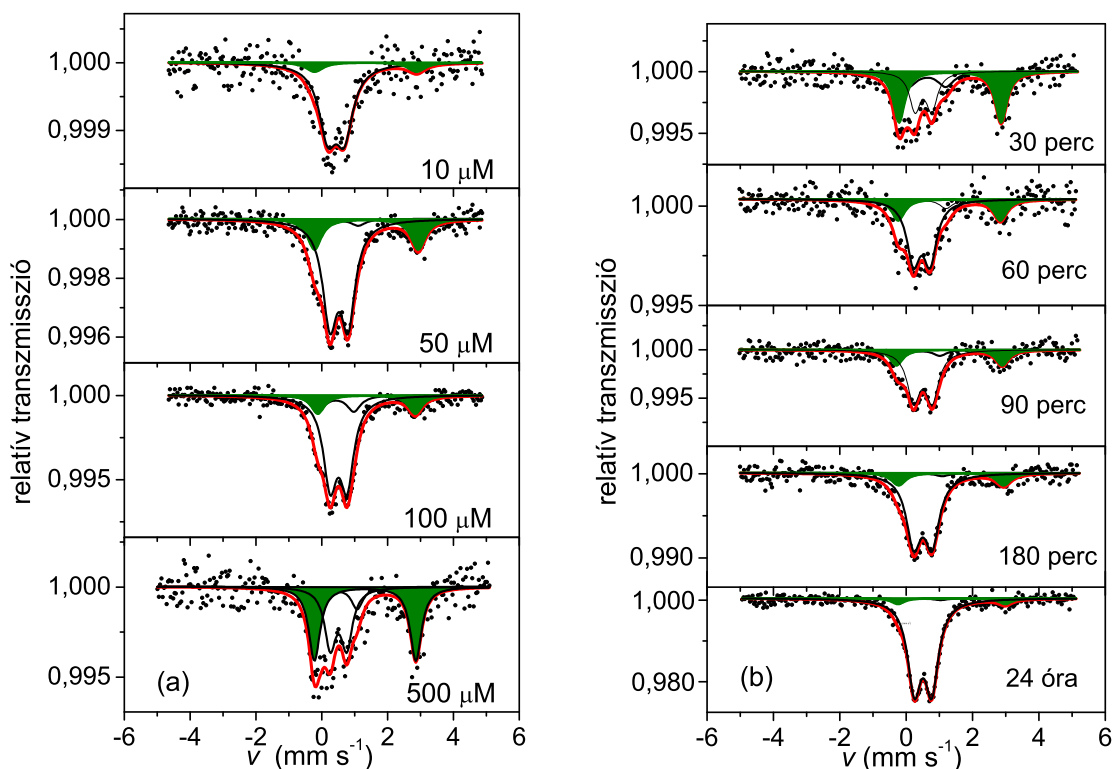
³³A vashiányosan nevelt növények esetén a vasellátás előtti vastartalom elhanyagolhatóan kicsi.



42. ábra. Vashiányosan nevelt, majd Fe^{III} -citráttal elátott uborka gyökér vastartalma: (a) 30 perc vasellátási idő, növekvő Fe-koncentráció, (b) 500 μM Fe-koncentráció, növekvő vasellátási idő. A szimplaszt vastartalmának meghatározása a Bienfait által javasolt mosási technika alkalmazása után történt, a Fe^{III} - és Fe^{II} -tartalmat a gyökerek 80 K hőmérsékleten felvett Mössbauer-spektrumai segítségével, a spektrumvonalak alatti területek alapján becsültem meg.

alapján elmondható, hogy a 30 percig alkalmazott legkisebb vaskoncentráció ($10\ \mu\text{M}$) esetén a mosás előtti és utáni vasmennyiségek közel megegyeznek, azaz a teljes felvett vasmennyiség a szimplasztba kerül. A teljes vastartalom és a szimplaszt vastartalma között azonban nagyobb vaskoncentrációk esetén ($100\text{--}500\ \mu\text{M}$) jelentősen megnő a különbség: $500\ \mu\text{M}$ Fe^{III} -citrát 30 perces alkalmazása során a szimplaszt vastartalma a teljes vasmennyiség csupán 36 %-át teszi ki. Azonos vaskoncentráció növekvő ideig történő alkalmazása (42 (b). ábra) esetén a teljes vasmennyiség mérsékelt növekedést mutat (1 nap elteltével háromszoros a változás a 30 perces vasellátáshoz képest), míg a szimplaszt vastartalmában hétszeres növekedés tapasztalható.

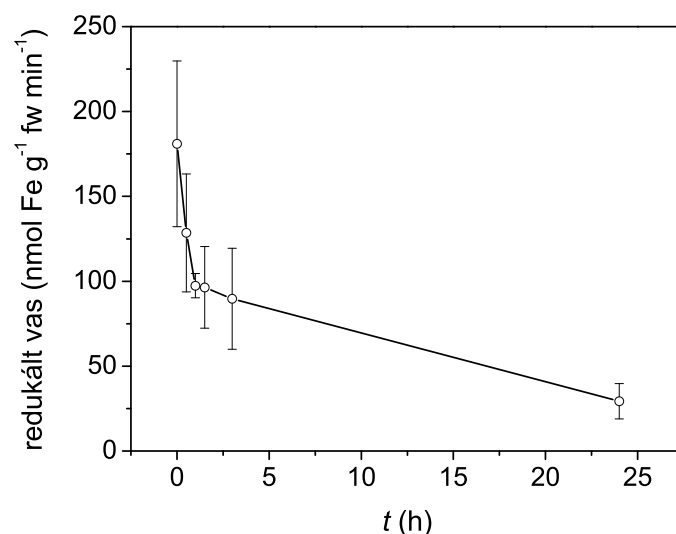
A vashiányos növények Mössbauer-spektrumait a 43. ábra mutatja, a spektrumok felbontása során kapott egyes Fe-komponensek összes vastartalom alapján számolt mennyisége a 42. ábrán látható. A Mössbauer-spektrumok kiértékelését a normális vasellátottságú növények 80 K-es spektruma alapján végeztem. Az optimális vasellátottságú növények spektrumaihoz képest szembejövő változás egy új dublett komponens megjelenése, mely Mössbauer-paraméterei szerint +2 oxidációs állapotú vasnak feleltethető meg.



43. ábra. Vashiányosan nevelt, majd Fe^{III} -citráttal elátott uborka gyökerek Mössbauer-spektrumai 80 K hőmérsékleten: (a) 30 perc vasellátási idő, növekvő Fe-koncentráció (b) $500\ \mu\text{M}$ Fe-koncentráció, növekvő vasellátási idő.

A Fe^{II} mennyisége a vasellátás idejétől és koncentrációjától függ: a vasellátás idejét növelve 48%-ról 6%-ra csökken, illetve a vaskoncentrációt növelve 13%-ról 48%-ra nő. A +3 oxidációs állapotban lévő vasat jelölő dublettet az említett modell alapján (3.4.2.fejezet) felbontva a gyökerekben két Fe^{III} -komponens jelenik meg: Fe^{III} -karboxilátok és jarozit ($\text{Fe}_\text{A}^{\text{III}}$, $\text{Fe}_\text{C}^{\text{III}}$), ellenben a ferrihidrit komponens ($\text{Fe}_\text{B}^{\text{III}}$) nem látható. A vastartalom főként Fe^{III} -karboxilátok formájában található meg. Ezek a Fe^{III} -karboxilátok adják a különböző koncentrációjú vassal azonos ideig ellátott gyökerek spektrumában is a fő járulékot.

A gyökér vastartalmának mérése mellett elvégeztem a két különböző módon nevelt uborka növény vas-kelát reduktáz aktivitás mérését is, mely a gyökér reduktív kapacitásnak változásáról ad információt. Amennyiben a vashiányos uborka növényeket növekvő ideig látjuk el vassal, a gyökér reduktív kapacitása csökkenést mutat (44. ábra) azonban a 24 órás kezelés után sem csökken le a normál vasellátás mellett nevelt gyökerekben mért értékig, mely $7,5 \pm 3,7 \text{ nmol Fe perc}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ fw}$ (ahol fw = frisstömeg). Az azonos ideig különböző vaskoncentrációval ellátott növények esetében a vas-kelát reduktáz aktivitás a koncentráció függvényében nem változik.



44. ábra. A vashiányosan nevelt, majd különböző ideig 500 μM Fe^{III} -citráttal ellátott uborka gyökerek vas-kelát reduktáz aktivitás értékei.

A vashiányos esetben kapott eredményeket a normál vasellátás eredményeivel kiegészítve nemcsak a felvett vas állapotáról, hanem a gyökérben működő redukciós és oxidációs folyamatok egymáshoz viszonyított sebességéről is információt kaphatunk. A 3.4.2. fejezet alapján megfelelő vasellátás esetén nem mutatható ki +2 oxidációs állapotú vas az uborka gyökerében. Mivel az uborka vasszorbálási mechanizmusát tekintve

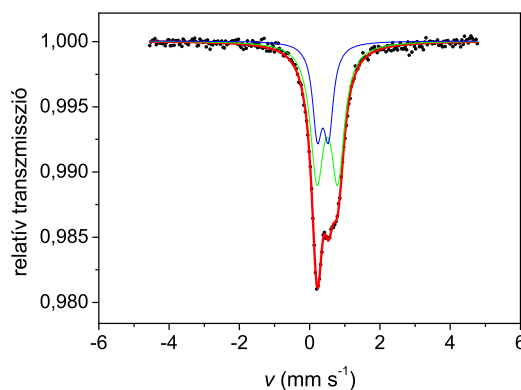
az I. stratégiához tartozik, és a gyökerek összes vasmennyisége normál és 30 perces vasellátottság esetén közel azonos ($\sim 48 \mu\text{mol}$ normális vasellátottság, illetve $\sim 44 \mu\text{mol}$ 30 perc vasellátottság mellett), ez utóbbi eset csak úgy lehetséges, hogy a gyökerekben a redukció, és a redukciót követő sejten belüli visszaoxidáció sebessége a vassal ellátott és vashiányos esetben különböző. Normál vasellátottság mellett a redukció sebessége kicsi, és a membránon keresztül történő transzport, illetve az ezt követő oxidáció sebessége a redukcióval megegyezik. A Fe^{III} -citráton nevelt, normális vasellátottságú uborka gyökérének vastartalma ugyanis $2 \mu\text{mol Fe g}^{-1}$ fw, redukzív kapacitásuk pedig $7,5 \text{ nmol Fe perc}^{-1} \text{ g}^{-1}$ fw, a vas-kelát reduktáz enzim pH-optimumán mérve. Ez 30 perc alatt $\sim 10\%$ Fe^{II} -t eredményezne a normál mennyiségű vassal ellátott gyökerekben is. Ez utóbbi mintákban azonban – ahogy fent bemutattam – $+2$ oxidációs állapotú vas Mössbauer-spektroszkópiával nem mutatható ki. Mindez azt jelenti, hogy a reoxidáció sebessége a redukció sebességével egyenlő és a gyökerekben a vas nem $+2$, hanem $+3$ oxidációs állapotban akkumulálódik. Növényélettani adatokat figyelembe véve a folyamat érthető, ugyanis a szabad Fe^{2+} sejten belüli megjelenése – a Fenton-reakció miatt – reaktív gyökök képződését okozná és így a sejtekre nézve mérgező lenne [70].

Vashiányos nevelés esetén azonban a gyökerek redukzív kapacitása jelentősen megnő, ami a 30 perces, $500 \mu\text{M } ^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrátos kezelés után 48% Fe^{II} megjelenését eredményezi (43 (a). ábra). A $+2$ oxidációs állapotú vas kimutatása egyértelmű bizonyítékot szolgáltat a vasfelvétel I. stratégiai mechanizmusát illetően. A Fe^{II} időbeli csökkenése pedig a gyökerek vastartalmának növekedésével, és így a vashiányos állapot fokozatos megszűnésével (ezzel párhuzamosan a redukciós kapacitás csökkenésével) magyarázható. A Fe^{II} -komponens – Mössbauer-paraméterei alapján ($\delta = 1,3 \text{ mm s}^{-1}$, $\Delta = 3,2 \text{ mm s}^{-1}$ 80 K hőmérsékleten) – Fe^{2+} -hexaakva komplexként azonosítható [30]. Ez utóbbi lehet a redukcióért felelős FRO2 enzim elsődleges terméke, mely az apoplasztban – eredményeim alapján – nem kapcsolódik közvetlenül semmilyen szabad funkciós csoporthoz (pl. pektátokhoz). A hexaakva-környezet kialakulását a sejtfal erőteljes savasodása is segítheti, hiszen a tápoldat pH-ja a vashiány következtében 4,9-ről 3,7-re csökken. A vashiányos állapottal és az ezt kísérő erőteljes savasodással magyarázható a ferrihidrit-komponens hiánya mind az apoplasztban, mind a szimplasztban, míg a jarozit-típusú komponens megjelenése a savas környezetben kedvezményezett.

A $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ arányt a gyökérben az apoplasztban történő adszorpció, a redukció sebessége, a felvétel és a visszaoxidáció együttesen határozza meg. A $10 \mu\text{M Fe}^{\text{III}}$ -citrát ellátás esetén a teljes és a szövetből el nem távolítható (szimplasztbeli) vastartalom közel megegyezik, azonban ez $500 \mu\text{M Fe}^{\text{III}}$ -citrát ellátás esetén 36% -ra csökken, utalva a vas apoplasztbeli akkumulációjára. A 10, 50, 100 és $500 \mu\text{M } ^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát vas-

ellátás esetén a gyökerek apoplastbéli vaskoncentrációját³⁴ a 30 perc alatt redukálható vas mennyiségével³⁵ összevetve látható, hogy a redukciós kapacitás elég nagy az összes apoplastban található vas redukálásához. A legnagyobb vaskoncentráció esetén a Mössbauer-spektrumokban megjelenő 48% Fe^{II} tehát egyértelműen jelzi, hogy az apoplastban elsősorban a +2 oxidációs állapotú vas halmozódik fel. Ez egyben alátámasztja, hogy a vashiányos gyökerekben a redukció sebessége nagyobb, mint a vas membránon keresztüli transzportjának vagy a visszaoxidációnak a sebessége.

A mennyiségi analitikai adatok alapján a vashiányosan nevelt, majd 30 percig $500 \mu\text{M}$ $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citráttal ellátott növények esetében fennáll a lehetősége, hogy az apoplast vastartalmának eltávolítása után a szimplaszt vastartalmáról szelektíven kapjunk információt. Az említett módon kezelt uborka gyökér Mössbauer-spektruma a 45. ábrán látható, a spektrum felbontása során kapott Mössbauer-paramétereket a 18. táblázat tartalmazza.



45. ábra. A vashiányosan nevelt, 30 percig $500 \mu\text{M}$ $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citráttal ellátott uborka gyökér Mössbauer-spektruma a Bienfait-eljárás alkalmazása után. A mérést 80 K hőmérsékleten végeztem.

komponens	δ (mm s^{-1})	Δ (mm s^{-1})	Γ (mm s^{-1})	S (%)
Fe^{III}	0,52(1)	0,61(1)	0,41(1)	51(2)
Fe^{II}	0,40(1)	0,36(1)	0,41(1)	49(2)

18. táblázat. A vashiányosan nevelt, 30 percig $500 \mu\text{M}$ $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citráttal ellátott, majd Bienfait eljárással kezelt gyökér Mössbauer-spektruma alapján kapott paraméterek.

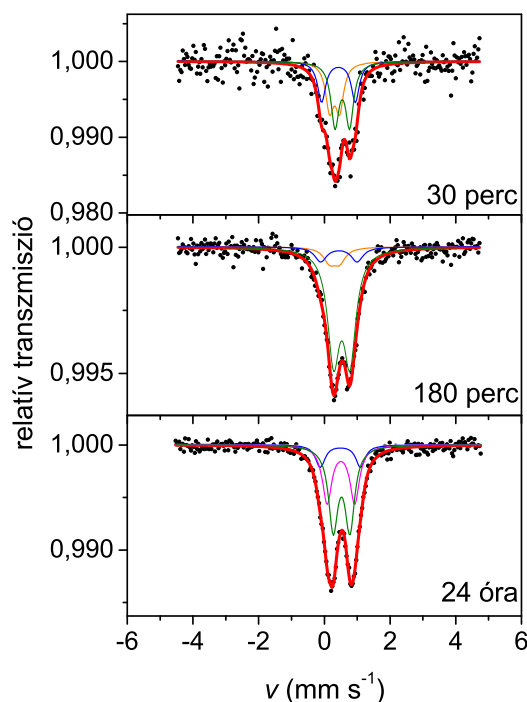
Az aszimmetrikus spektrum két dublettre bontható fel, mely egyértelműen jelzi az eddig azonosított vegyületekhez képest egy új spektrumkomponens jelenlétét ($\delta =$

³⁴Az apoplast vaskoncentrációja a teljes vaskoncentráció és a szimplaszt vaskoncentrációjának különbségéből számítható a 42. (a) ábra adatai alapján. A kapott értékek: 0,1; 0,4; 0,7; 1,2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw, növekvő koncentrációjú vasellátásra.

³⁵3,9 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw, a növekvő vasellátás esetén mért redukzív kapacitások átlagos értéke.

$0,40 \text{ mm s}^{-1}$, $\Delta = 0,36 \text{ mm s}^{-1}$). Ez utóbbi – Mössbauer-paramétereit figyelembe véve – szerkezetében valószínűleg eltér az eddigi oktaéderes O_6 -koordinációjú Fe^{III} -karboxilátként azonosított komponensektől. A vegyület azonosítása azonban további kísérleti munkát kíván. A $0,52 \text{ mm s}^{-1}$ izomereltolódású és $0,61 \text{ mm s}^{-1}$ kvadrupólus felhasadású dublett az irodalmi adatok [62] és saját méréseim (3.4.1. fejezet) alapján Fe^{III} -citrátnak ($[\text{Fe}_2\text{Cit}_2(\text{OH})_2]^{2-}$, ahol Cit=citrát) feleltethető meg. Ez az eredmény megerősíti, hogy a gyökérsejtek citoplazmájában Fe^{III} -citrát vasellátás mellett jelentős mennyiségű Fe^{III} -citrát található, ami valószínűleg a gyökérből a hajtás felé történő transzportban is elsődleges szerepet játszik. Emellett alátámasztja a 3.4.2. fejezetben a normál vasellátás mellett nevelt uborka Mössbauer-spektrumainak analízise során alkalmazott, a Fe^{III} -karboxilátokat (többek között Fe^{III} -citrátot) feltételező modell jogságát.

A vasfelvételi stratégiák összehasonlítása végett a vashiányos kísérletet búza növényekkel is megismételtem. Vashiányosan nevelt búzát láttam el $500 \mu\text{M}$ $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citráttal különböző ideig. A gyökerek Mössbauer-spektrumait a 46. ábra mutatja.



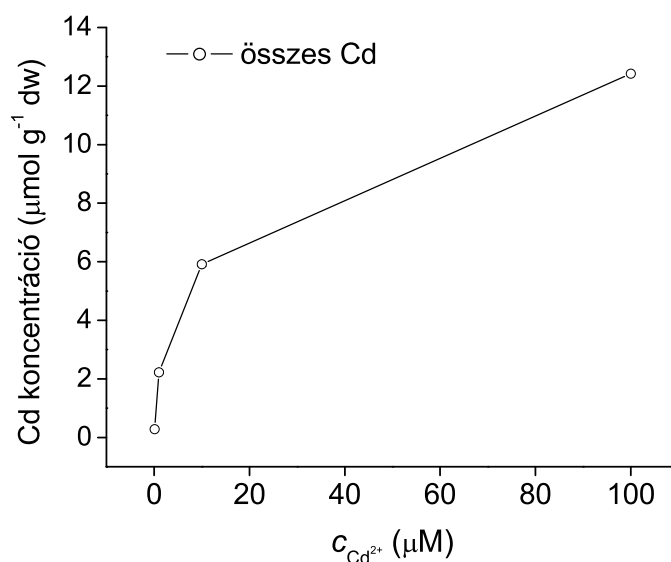
46. ábra. A vashiányosan nevelt, majd különböző ideig $500 \mu\text{M}$ $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citráttal ellátott búza gyökerek Mössbauer-spektrumai 80 K hőmérsékleten. A vasellátás idejét a spektrumok mellett tüntettem fel.

A Mössbauer-spektrumokon a legnagyobb különbség a vashiányos uborkához képest a Fe^{II} hiánya. Ez az eredmény alátámasztja a vasfelvétel szerint II. stratégiához tartozó növényekre a vas redukcióján alapuló vasfelvételi mechanizmustól való elté-

rést. A Fe^{III} -komponensek kiértékelése sem egyezik meg a vashiányos uborka esetén alkalmazott, két Fe^{III} -komponenst feltételező modellel. A spektrumok alakja ugyanis aszimmetrikus dublett, ami egy $0,3 \text{ mm s}^{-1}$ izomereltoldású és $0,3 \text{ mm s}^{-1}$ kvadrupólus felhasadású alspektrum jelenlétére utal a már azonosított $\text{Fe}_\text{A}^{\text{III}}$ és $\text{Fe}_\text{C}^{\text{III}}$ komponensek mellett. Ez a komponens – kis intenzitása miatt – már 180 perc vasellátás esetén is nehezen illeszthető, míg 24 óra vasellátás után teljesen eltűnik a spektrumból, és a kapott Mössbauer-spektrum a vassal elátott búza (illetve egyben a vassal elátott uborka) spektrumával egyezik meg. Az első két mintában az új komponens a búza vashiány miatt fokozódott fitosziderofór kibocsátásával lehet kapcsolatban, azonban nem zárhatjuk ki azt a lehetőséget sem, hogy az összes ^{57}Fe kisebb mennyisége miatt³⁶ olyan, sejten belüli komponens ad járulékot a spektrumban, melyet más esetben a többi komponens nagy relatív mennyisége miatt nem tudunk detektálni.

3.4.4. Kadmium hatása az uborka vasszorbására

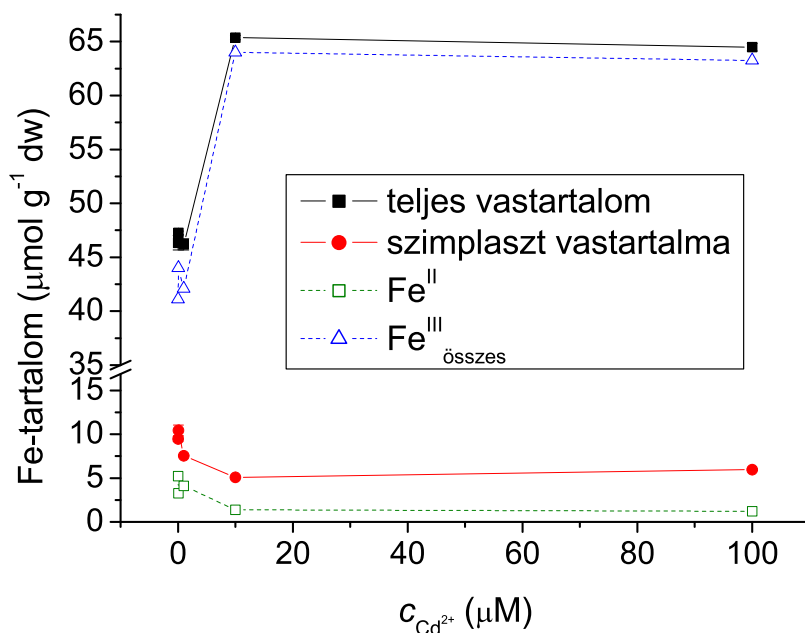
A vashiányosan nevelt, 3 órán keresztül $0,1$, 1 , 10 , $100 \text{ }\mu\text{M}$ Cd-mal szennyezett uborka növények gyökere a Cd-koncentráció növelésével párhuzamosan növekvő mennyiségű Cd-ot tartalmaz, ahogy ezt a 47. ábra mutatja. A teljes Cd-mennyiség még a legnagyobb Cd-koncentráció ($100 \text{ }\mu\text{M}$) esetén sem ér el telítési értéket.



47. ábra. A vashiányos növények gyökerében mért Cd-koncentráció 3 órás Cd-kezelést követően.

³⁶A búza magjában nagy mennyiségű természetes izotópeloszlású vas halmozódik fel, így –az uborkával ellentétben– a vashiányosan nevelt növény is viszonylag sok vasat tartalmaz. Ezért a tápoldatból kevesebb ^{57}Fe tud beépülni a szövetekbe.

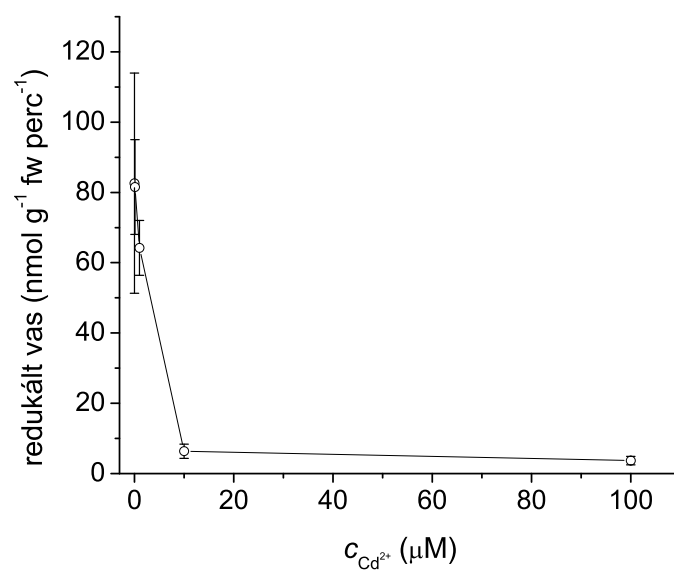
A Cd-adagolással párhuzamosan történő 30 perces, 500 μM vasellátás alatt a vashiányos gyökerek növekvő mennyiségű vasat adszorbeálnak (48. ábra). A kontroll növények esetében, ahol a tápoldat nem tartalmazott Cd-ot, a szimplaszt vastartalma az összes vasmennyiséghez képest 20 %-nak adódik. 0,1 μM Cd-koncentráció esetén a teljes vasmennyiség 22 %-a van a szimplasztban. Ezzel szemben a Cd mennyiségét 100 μM -ra növelve a szimplaszt vastartalma 9 %-ra csökken, míg a teljes vastartalom nő, mely az apoplasztban felhalmozott vas jelentős növekedését jelzi.



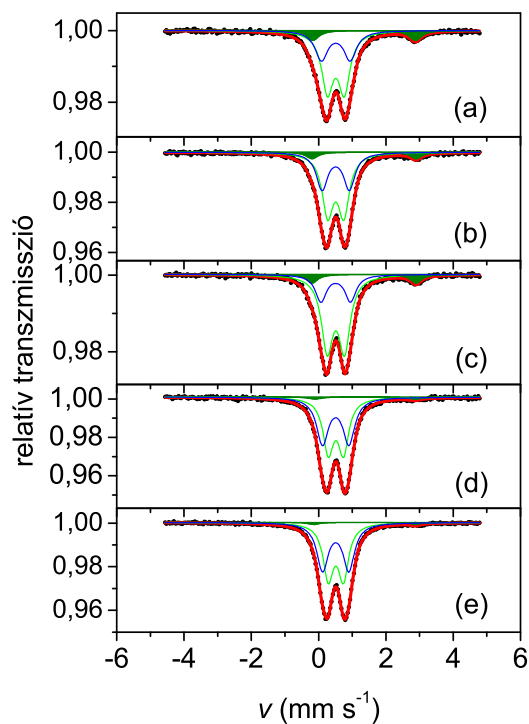
48. ábra. Vashiányosan nevelt, majd 3 órán keresztül növekvő mennyiségű $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -tal szennyezett uborka gyökér vastartalma 30 perces, 500 μM -os $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát vasellátás után.

Az uborka gyökerek vas-kelát reduktáz enzim aktivitása a 3 órás Cd-kezelés után mérve a 49. ábrán látható. Ez alapján megállapítható, hogy 1 μM -nál nagyobb koncentrációjú Cd hatására az időegység alatt redukált vas mennyisége ugrásszerűen lecsökken, elérve az optimális vasellátás esetén mérhető értéket ($7,5 \pm 3,7 \text{ nmol Fe g}^{-1} \text{ fw perc}^{-1}$).

A Cd-mal 3 óráig szennyezett, vashiányosan nevelt uborka gyökerek Mössbauer-spektrumai a 30 perces vasellátást követően eltérést mutatnak a kontroll, Cd-mentes állapothoz képest, ahogy ez az 50. ábrán látható. A Mössbauer-spektrumokat – az uborkára kapott korábbi eredményeket figyelembe véve – három alspektrumra bontottam fel. Az egyes dublettek átlagos Mössbauer-paramétereik alapján ($\delta = 0,5 \text{ mm s}^{-1}$, $\Delta = 0,5$ és $\Delta = 0,8 \text{ mm s}^{-1}$) a korábban azonosított $\text{Fe}_\text{A}^{\text{III}}$, illetve $\text{Fe}_\text{B}^{\text{III}}$ komponenseknek feleltethetők meg (Fe^{III} -karboxilátok és ferrihidrit), a harmadik alspektrum ($\delta = 1,4 \text{ mm s}^{-1}$, $\Delta = 3,1 \text{ mm s}^{-1}$) +2 oxidációs állapotú vasat jelöl, hexaakva-komplex formában. A



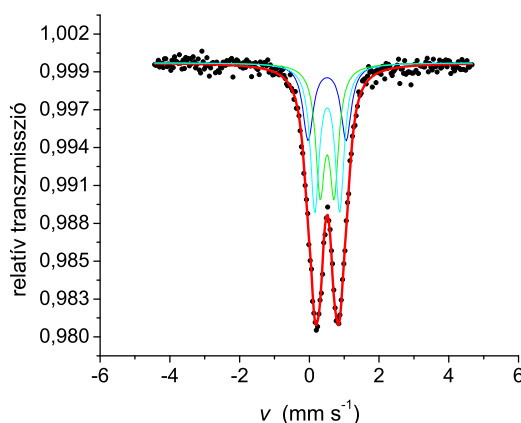
49. ábra. A vashiányosan nevelt, majd $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -tal 3 órán keresztül szennyezett növények vas-kelát reduktáz aktivitása az alkalmazott Cd-szennyezés koncentrációjának függvényében.



50. ábra. A vashiányosan nevelt, majd különböző koncentrációjú $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -tal 3 órán keresztül szennyezett növények Mössbauer-spektrumai 30 perces $500 \mu\text{M } ^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát ellátás után, 80 K hőmérsékleten mérve. (a) $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -mentes kontroll (b) $0,1 \mu\text{M } \text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, (c) $1,0 \mu\text{M } \text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, (d) $10 \mu\text{M } \text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, (e) $100 \mu\text{M } \text{Cd}(\text{NO}_3)_2$

Fe^{2+} mennyiségének változását a 48. ábra mutatja, ami alapján látható, hogy Cd-szennyezés koncentrációjának növelésével a redukált vas 11 %-ról 2 %-ra csökken.

Vassal optimális mennyiségben ellátott, de Cd-ot tartalmazó növények gyökerének Mössbauer-spektrumai (51. ábra) nem mutatnak +2 oxidációs állapotú vasat. A spektrum nem különbözik a Cd nélkül nevelt minták Mössbauer-spektrumától, a vas(III) komponenseket reprezentáló szimmetrikus dublett a megfelelő mennyiségű vasellátás mellett nevelt uborka spektrumával megegyezően bontható alspektrumokra (3.4.2. fejezet, 19. táblázat).



51. ábra. 10^{-5} M $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ tartalmú tápoldatban, normális vasellátás (10^{-5} M $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát) mellett nevelt uborka gyökér Mössbauer-spektruma, 80 K hőmérsékleten.

komponens	δ (mm s^{-1})	Δ (mm s^{-1})	Γ (mm s^{-1})	S (%)
Fe_A^{III}	0,512(3)	0,40(4)	0,31(3)	35
Fe_B^{III}	0,514(2)	0,71(4)	0,31(4)	40
Fe_C^{III}	0,51(1)	1,09(5)	0,36(3)	25

19. táblázat. 10^{-5} M $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát és 10^{-5} M $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ mellett nevelt uborka gyökér 80 K-en mért Mössbauer-spektrumának paraméterei.

A vashiányos növények Mössbauer-spektrumaiban mért Fe^{2+} -komponens a korábbi eredményeket figyelembe véve (3.4.3. fejezet) nem meglepő. A Fe^{2+} mennyiségének csökkenése és a vas-kelát reduktáz enzim aktivitásának mérése alapján megállapítható, hogy a Cd jelenléte csökkenti a gyökér reduktív kapacitását. Megjegyzendő, hogy ez a hatás csak 1 μM Cd-koncentráció felett jelentkezik, tehát feltételezhetően a redukációs folyamat gátlásához egy kritikus mennyiségű Cd szükséges.

Megfigyelhető, hogy a Fe^{2+} -tartalommal párhuzamosan a szimplaszt vastartalma is csökken, jöllehet a teljes vasmennyiség, ami 10 μM -os Cd-koncentráció esetén telítődést mutat, nő. Ez egyértelműen jelzi a vas apoplasztban történő felhalmozódását. A

Mössbauer-mérések eredményét is figyelembe véve az említett akkumuláció elsősorban Fe^{III} -vegyületek formájában történik.

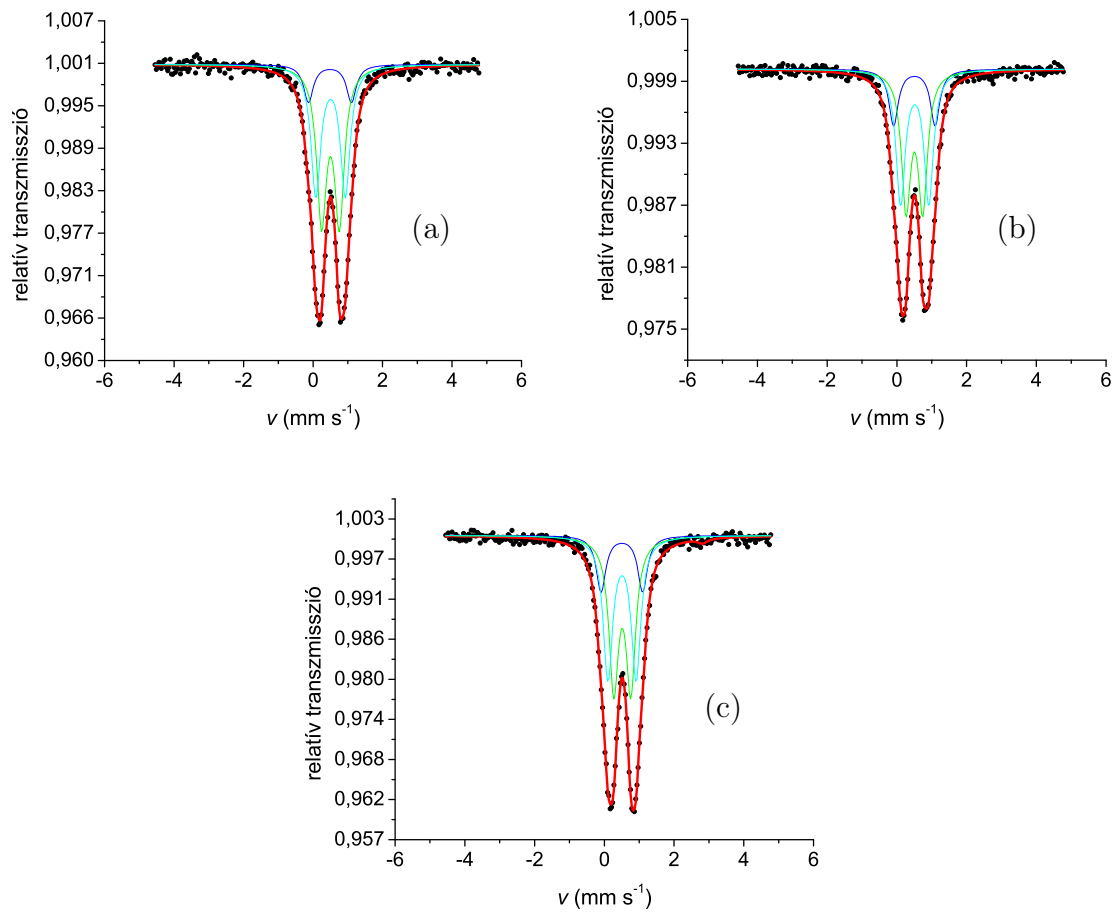
A nagy Cd^{2+} -koncentráció esetén a vashiányos gyökerekre mérhető vas-kelát reduk-táz aktivitás értékei a megfelelő vasellátottságú növényekével azonosak. Ennek ellenére a Mössbauer-spektrumokban csak a vashiányos növények esetén mutatható ki Fe^{2+} -komponens, optimális vasellátottság mellett nem. Ez jelzi, hogy a Fe^{III} -komponensek mellett a Fe^{II} is akkumulálódik az apoplasztban. A Fe^{II} akkumulációja alapján feltételezhető, hogy a Fe^{2+} membránon keresztül történő transzportját, vagy a transzportot követő sejten belüli reoxidáció folyamatát a Cd-kezelés erősen csökkenti. Ez megerősíti azt a korábbi megfigyelést, mely szerint a Cd^{2+} - és Fe^{2+} -ionok a membránon keresztül történő transzportban egymás helyére léphetnek [73]. A Fe^{2+} akkumulációja pedig – a Fenton reakció miatt – oxidatív stresszhatás tüneteit okozhatja.

Az egyes Fe^{III} -komponensek Cd hozzáadására, illetve a Cd-koncentráció növelésére nem mutattak változást. Ez alapján feltételezhető, hogy a gyökéren Fe^{III} -formában raktározódó vas állapotára a Cd-szennyezésnek nincs jelentős hatása.

3.4.5. Az indolecetsav búza gyökerekre gyakorolt hatásainak vizsgálata

Az IAA búza növények vasfelvételére gyakorolt hatását két, különböző IAA tartalmú tápoldatban nevelt búza segítségével vizsgáltam. Az IAA nélkül, illetve annak jelenlétében nevelt búza gyökerének Mössbauer-spektrumai az 52. ábrán láthatók.

A Mössbauer-spektrumok alapján látható, hogy a kontroll, IAA hozzáadása nélkül nevelt búza növényekhez képest a gyökérben raktározott vas állapotában nem mutat-ható ki változás. Ez azt jelenti, hogy az IAA bizonyított reduk-tív hatása (2.4.1. feje-zet) ellenére sem képződik kimutatható mennyiségű $+2$ oxidációs állapotú vas a búza gyökerében. Eredményeim alapján tehát valószínűsíthető, hogy az IAA vasfelvételre gyakorolt hatása a II. vasfelvételi stratégiát követő növények esetén nem számottevő, jóllehet korábbi irodalmi adatok a gyökér vashiányos állapotához hasonló morfológiai változásairól számoltak be [85]. Természetesen az IAA hatásai nemcsak közvetlenül a vas állapotának, hanem közvetetten a vasfelvételben szerepet játszó enzimek működésének megváltoztatásán keresztül is érvényesülhetnek. Ez utóbbi hatások azonban Mössbauer-spektroszkópia segítségével nehezen követhetők.



52. ábra. (a) IAA hozzáadása nélkül, (b) 10^{-4} M IAA koncentráció mellett és (c) 10^{-9} M IAA koncentráció mellett nevelt búza növények gyökerének Mössbauer-spektrumai 80 K hőmérsékleten. A vasellátás minden esetben $10\ \mu\text{M}\ ^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrát formájában történt.

4.

Eredményeim összefoglalása

A növényi hormonháztartásban szerepet játszó indol-3-ecetsav (IAA) és a vas(III) kölcsönhatását elsődlegesen ^{57}Fe Mössbauer-spektroszkópia segítségével vizsgálva a következő megállapításokat tettem:

- I. Kimutattam, hogy $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ és FeCl_3 2-es pH-jú vizes oldatában az IAA hozzáadására egy Fe^{2+} és egy dimer Fe^{3+} komponens képződik. Ebből arra következtettem, hogy a rendszerben kétféle reakció játszódik le. Az egyik reakció egy komplexképződés a Fe^{3+} ionok és az IAA részecskék között, mely egyben a Fe^{3+} ionok dimerizálódásával jár. A másik reakció egy redoxi folyamat az IAA molekulák és a Fe^{3+} részecskék között, ami egy [hexaakva-vas(II)] komplex képződését eredményezi.
- II. Megállapítottam, hogy a vizes közegben csapadékként keletkező szilárd Fe-IAA komplex összetétele $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2(\text{IA})_4]$ összegképlettel jellemezhető (IA = indol-3-acetát). A komplexben a Fe^{3+} ionok $(\mu\text{-OH})_2$ -hídon keresztül kapcsolódnak egymáshoz, és az IAA molekulák deprotonálódás után, kétfogú karboxilátligandum formájában koordinálódnak a központi ionokhoz.

A növények vasfelvételét elsődlegesen ^{57}Fe Mössbauer-spektroszkópia segítségével vizsgálva a következő megállapításokat tettem:

- I. Optimális vasellátottság mellett mind az uborka, mind a búza gyökerében a vas három fő vas(III) kémiai környezetben akkumulálódik, aminek megfelelő vasvegyületek a vas(III)-karboxilátok, a ferrihidrit és a vas(III)-szulfát-hidroxid.
- II. Közvetlen bizonyítékot adtam az I. vasfelvételi stratégiát követő növények vasfelvételi mechanizmusára. A bizonyítás azon alapult, hogy Fe^{2+} jelenlétét mutattam ki a vasfelvétel során uborka gyökerében.
- III. Kimutattam, hogy a vashiányos, majd vassal ellátott uborka gyökerében talált Fe^{2+} vegyület [hexaakva-vas(II)] komplex formájában van jelen, a vas-kelát redukáz enzim elsődleges termékeként. Megállapítottam továbbá, hogy a [hexaakva-vas(II)] komplex akkumulálódik az apoplastban a vashiányos állapot után alkalmazott vasellátás során. Ez a vas redukciójának a reoxidációjához képest történő gyors végbemenetelét jelzi a vasfelvétel során.

- IV. Megmutattam, hogy a II. vasfelvételi stratégiát követő búza gyökerében a vasfelvétel során nem képződik kimutatható mennyiségű $+2$ oxidációs állapotú vasvegyület. Ez az eredmény alátámasztja, hogy a II. vasfelvételi stratégiához tartozó növények vasfelvétele során a vas(III) nem redukálódik.
- V. Uborka gyökerére vonatkozó eredményeimmel megerősítettem, hogy az I. vasfelvételi stratégiát követő növények esetén a Cd^{2+} jelenléte csökkenti a vas-kelát reduktáz enzim aktivitását vashiányos növények esetén. Megállapítottam, hogy a Cd^{2+} gátolja a Fe^{2+} szimplasztba történő transzportját. Megmutattam, hogy a Cd nem befolyásolja a gyökérben megtalálható három fő vas(III)vegyület előfordulását.

5.

Köszönetnyilvánítás

Ezen a helyen szeretném kifejezni köszönetemet mindazok számára, akik munkám elvégzésében és az értekezés elkészítésében segítségemre voltak. Köszönetet mondok:

- témavezetőmnek, Dr. Vértés Attilának, aki megismertetett a Mössbauer-spektroszkópiával és szakmai oldalról irányította kutatómunkámat;
- konzulenseimnek, Dr. Fodor Ferencnek és Dr. Kuzmann Ernőnek, akik a kutatásban vezető szerepet játszottak, és értekezésemhez kritikus észrevételeikkel és javaslataikkal nagy mértékben hozzájárultak;
- a Magkémiai Laboratórium vezetőjének, Dr. Homonnay Zoltánnak, aki rengeteg erőfeszítéssel és kitartó támogatással lehetővé tette munkám elkészítését a Laboratóriumban;
- az ELTE Növényélettani és Molekuláris Biológiai Tanszékén Dr. Cseh Editnek, aki számos konzultáció során egészítette ki növényélettani ismereteimet és tanácsaival az egyes kísérletek megtervezéséhez jelentős segítséget nyújtott;
- a Magkémiai Laboratórium összes munkatársának szakmai és emberi támogatásukért;
- hazai és külföldi együttműködő partnereinknek, akik az elvégzett vizsgálatokban segítséget nyújtottak (a teljes listát a témákban megjelent közlemények tartalmazzák);
- Köszönetet mondok a pénzügyi támogatásért az ELTE Kémia Doktori Iskolának, az OTKA-nak (K 62691, K 67835, K 68135, NN 74045), illetve a francia-magyar (F-22/2005) és a cseh-magyar (CZ-11/2007) együttműködéseket biztosító NKTH-nak.

6.

Függelék

Az vas(III)-indolecetsav rendszer vizsgálatához felhasznált minták pontos összetételeit az alább feltüntetett táblázatok tartalmazzák.

6.1. A Mössbauer-spektroszkópiás mérésekhez felhasznált minták összetétele

minta	0,1 M-os $^{57}\text{Fe}^{3+}$ -oldat	H_2O	a ligandum 0,05 M-os oldata	pH	lefagyasztásig eltelt idő	megjegyzés
1.	0,15 cm ³	0,45 cm ³	0,9 cm ³ IAA	~ 2	15 perc	csapadék, szűrés
2.	0,15 cm ³	0,45 cm ³	0,9 cm ³ IAA	~ 2	2 nap	csapadék, szűrés
3.	0,15 cm ³	0,45 cm ³	0,9 cm ³ TRP	~ 2	15 perc	csapadék, szűrés
4.	0,15 cm ³	0,45 cm ³	0,9 cm ³ ICA	~ 2	15 perc	csapadék, szűrés
5.	0,15 cm ³	0,45 cm ³	0,9 cm ³ IPA	~ 2	15 perc	csapadék, szűrés
6.	0,15 cm ³	0,45 cm ³	0,9 cm ³ IBA	~ 2	15 perc	csapadék, szűrés

20. táblázat. A Mössbauer-analízishez felhasznált vizes $^{57}\text{Fe}^{3+}$ -L (L: IAA, TRP, ICA, IPA, IBA) oldatok összetétele.

minta	kiindulási anyagok	oldószer	lefagyasztásig eltelt idő
1.	$^{57}\text{FeCl}_3$ (vízmentes) + IAA (Fe:IAA=1:3)	etanol-víz (1:1)	50 s
2.	$^{57}\text{FeCl}_3$ (vízmentes) + IAA (Fe:IAA=1:3)	etanol-víz (1:1)	20 perc
3.	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ + IAA (Fe:IAA=1:3)	abszolút etanol	20 perc
4.	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ + IAA (Fe:IAA=1:3)	etanol-víz (1:1)	20 perc

21. táblázat. A Mössbauer-analízishez felhasznált, szerves oldószerekben készített Fe^{3+} -IAA oldatok összetétele. Az $^{57}\text{FeCl}_3$ és az $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ végső koncentrációja a mintákban 0,025 M és 0,1 M voltak.

minta	kiindulási anyagok	oldószer	lefagyasztásig eltelt idő
1.	71,2 mg ^{57}Fe -IAA komplex	1 cm ³ abszolút etanol	20 perc
2.	71,2 mg ^{57}Fe -IAA komplex	1 cm ³ aceton	20 perc
3.	71,2 mg ^{57}Fe -IAA komplex	1 cm ³ etanol + 0,02 cm ³ víz	20 perc
4.	71,2 mg ^{57}Fe -IAA komplex	1 cm ³ aceton + 0,02 cm ³ víz	20 perc

22. táblázat. A szilárd ^{57}Fe -IAA Mössbauer-spektroszkópiás vizsgálatához készített minták összetétele.

6.2. A spektrofotometriás mérésekhez felhasznált minták összetétele

A megállított áramlás technikával vizsgált reakcióelegyekben a Fe^{3+} és az IAA koncentrációi a 23. táblázatban feltüntetett 1:3, 1:12 Fe:IAA arányú összetételeknek feleltek meg. A szilárd anyag vizsgálata esetén 0,0289 mg/cm³ koncentrációjú oldatokat használtam fel.

minta	Fe:IAA arány	IAA törzsoldat	Fe^{3+} törzsoldat	hozzáadott oldószer
1.	1:1	0,250 cm ³	0,250 cm ³	2,750 cm ³
2.	1:3	0,750 cm ³	0,250 cm ³	2,250 cm ³
3.	1:12	3,000 cm ³	0,250 cm ³	—
4.	tiszta IAA	3,000 cm ³	—	0,250 cm ³
5.	tiszta Fe^{3+}	—	0,250 cm ³	3,000 cm ³

23. táblázat. A spektrofotometriás mérések során vizsgált különböző Fe^{3+} -IAA arányú minták összetétele. A törzsoldatok koncentrációja 0,05 M volt.

Irodalomjegyzék

- [1] Weyers, J. D. B.; Paterson, N. W. *New Phytologist* **2001**, *152*, 365–407.
- [2] Fitting, H. *Zeitschrift für Botanik* **1909**, *1*, 1–86.
- [3] Fitting, H. *Zeitschrift für Botanik* **1910**, *2*, 225–267.
- [4] Haagan-Smith, A. J.; Leach, W. D.; Bergren, W. R. *Am. J. Bot.* **1942**, *29*, 500–506.
- [5] Davies, P. J. (ed) *Plant Hormones. Biosynthesis, signal transduction, action!*, Clover Academic Publisher, Dodrecht, Boston, London, **2004**
- [6] Csiszár, J.; Erdei, L.; Pécsváradi, A.; Szabó, M.; Tari, I. *Növényélettan; Növekedés- és fejlődésélettan*, JATEPress, Szeged, **2004**
- [7] Patten, C. L.; Glick, B. R. *C. J. Microbiol.* **1996**, *42*, 207–220.
- [8] Costacurta, A.; Vanderleyden, J. *Crit. Rev. Microbiol.* **1995**, *21* (1), 1–18.
- [9] Kamnev, A. A.; Kuzmann, E. In: Carmona, P.; Navarro, R.; Hernanz, A. (eds.) *Spectroscopy of Biological Molecules: Modern Trends*. pp. 85. UNED Press, Madrid **1997**
- [10] Lovley, D. R. *FEMS Microbiol. Rev.* **1997**, *20*, 305–313.
- [11] Rioux, C. R.; Jordan, D. C.; Rattray, B. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *248*, 175–182.
- [12] Rioux, C. R.; Jordan, D. C.; Rattray, B. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *248*, 183–189.
- [13] Abramovitch, R. A.; Ahmed, K. S. *Nature* **1961**, *192*, 259–260.
- [14] Platt, R. S. Jr.; Thinmann, K. V. *Science* **1956**, *123*, 105–6.
- [15] Yamamoto, D.; Iso, N., *Meiji Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku* **1959**, No. 9, 19–20.
- [16] Goto, T.; Yamamoto, D. *Meiji Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku* **1958**, No. 7, 35–46.
- [17] Harrod, J. F.; Guérin, C. *Inorg. Chim. Acta* **1979**, *37*, 141–144.
- [18] Kamnev, A. A.; Kuzmann, E.; Perfiliev, Y. D.; Vankó, Gy; Vértes, A. *J. Mol. Struct.* **1999**, *482–483*, 703–711.

- [19] Gazaryan, I. G.; Lagrimini, L. M.; Ashby, G. A.; Thorneley, N. F. *Biochem. J.* **1996**, *313*, 841–847.
- [20] Savitsky, P. A.; Gazaryan, I. G.; Tishkov, V. I.; Lagrimini, L. M.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *Biochem. J.* **1999**, *340*, 579–583.
- [21] Hinmann, R. L.; Lang, J. *Biochemistry* **1965**, *4*, 144–158.
- [22] Kobayashi, S.; Sugioka, K.; Nakano, H.; Nakano, M.; Tero-Kubota, S. *Biochemistry* **1984**, *23*, 4589–4597.
- [23] Hu, T.; Dryhurst, G. *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *362*, 237–248.
- [24] Nan, C. G.; Feng, Z. Z.; Li, W. X.; Ping, D. J.; Qin, C. H. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *452*, 245–254.
- [25] Candeias, L. P.; Folkes, L. K.; Dennis, M. F.; Patel, K. B.; Everett, S. A.; Stratford, M. R. L.; Wardman, P. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 10131–10137.
- [26] Candeias, L. P.; Wardman, P.; Mason, R. P. *Biophys. Chem.* **1997**, *67*, 229–237.
- [27] Kiss, I.; Vértés, A. *Magkémia, Akadémiai Kiadó, Budapest*, **1979**; Vértés, A.; Kiss, I. *Nuclear Chemistry, Akadémiai Kiadó, Budapest*, **1987**
- [28] Wertheim, G. K. *Mössbauer Effect principles and Applications*, Academic Press, New York, London, **1968**
- [29] Greenwood, N. N.; Gibb, T. C. *Mössbauer Spectroscopy*, Chapman and Hall Ltd., London, **1971**
- [30] Vértés, A.; Korecz, L.; Burger, K. *Mössbauer Spectroscopy*, Academic Press, Budapest, **1979**; Vértés A.; Korecz L.; Burger K. *Studies in Physical and Theoretical Chemistry, Mössbauer spectroscopy*, Elsevier, Amsterdam, **1979**
- [31] Vértés, A.; Nagy, D. L. *Mössbauer Spectroscopy of Frozen Solutions*, Akadémiai Kiadó, Budapest, **1990**
- [32] Schatz, G.; Weidinger, A. *Nukleare festkörperphysik*, B. G. Taubner, Stuttgart, **1992**
- [33] Klencsár, Z.; Kuzmann, E.; Vértés, A. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **1996**, *210*, 105–114.
- [34] Blume, M.; Tjon, J. A. *Phys. Rev.* **1968**, *165*, 446–456.

- [35] Radni, T.; Ohtaki, H. *Mol. Phys.* **1996**, *87*, 103–121.
- [36] Hajdu, F.; Pálincás, G. *J. Appl. Cryst.* **1972**, *5*, 395–401.
- [37] Hajdu, F., *Acta Cryst. A* **1972**, *28*, 250–252.
- [38] Pálincás, G.; Radnai, T. *Acta Cryst. A* **1976**, *32*, 666–668.
- [39] Cromer, D. T.; Waber, J. T. *Acta Cryst.* **1965**, *18*, 104–109.
- [40] Vértess, A.; Parak, F. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1971**, 2062–2068.
- [41] Ferraro, J. R.; Walker, W. R. *Inorg. Chem.* **1965**, *4*, 1382–1386.
- [42] Degen, A.; Bolte, M. *Acta Cryst. E-Structure Reports Online* **2001**, *57*, Part 11, O999–O1000.
- [43] Morrison, T. I.; Reis, A. H. Jr.; Knapp, G. S.; Fradin, F. Y.; Chen, H.; Klippert, T. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3262–3264.
- [44] Arnon, D. I.; Stout, P. R. *Plant Physiol.* **1939**, *14*, 371–375.
- [45] Marschner, H.: Mineral Nutrition of Higher Plants, Academic Press, London, **1995**
- [46] Láng F.: Növényélettan; A növényi anyagcsere 1., ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, **2002**
- [47] Carpita, N.; Sabulase, D.; Montezinos, D.; Delmer, D. P. *Science* **1979**, *205*, 1144–1147.
- [48] Cornell, R. M.; Schwertmann, U.: The Iron Oxides, Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2006**
- [49] Cseh E. *Bot. Közlem.* **1987–88**, *74–75*, 289–302.
- [50] Römheld, V. *Physiol. Plant.* **1987**, *70*, 231–234.
- [51] Schmidt, W. *Trends Plants Sci.* **2003**, *8*, 188–193.
- [52] Robinson, N. J.; Procter, C. M.; Conolly, E. L.; Guerinot, M. L. *Nature* **1999**, *397*, 694–697.
- [53] Eide, D.; Broderius, M.; Feit, J.; Guerinot, M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 5624–5628.
- [54] Bienfait, H. F. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1985**, *17*, 73–83.

- [55] Marschner, H.; Kissel, M.; Römheld, V. *J. Plant Nutr.* **1986**, *9*, 695–713.
- [56] Murakami, T.; Ise, K.; Hayakawa, M.; Kamei, S.; Takagi, S. *Chem. Lett.* **1989**, 2137–2140.
- [57] Mori, S. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1999**, *2*, 250–253.
- [58] Curie, C.; Panaviene, Z.; Loulergue, C.; Dellaporta, S. L.; Briat, J-F.; Walker, E. L. *Nature* **2001**, *409*, 346–349.
- [59] Hope, A. B.; Stevens, P. G. *Aust. J. Sci. Res., Ser. B* **1952**, *5*, 335–343.
- [60] Cseh, E.; Váradi, Gy.; Fodor, F. *Bot. Közlem.* **1994**, *81*, 47–55.
- [61] Allison, J. D.; Brown, D. S.; Novo-Gradak, K. J. A geochemical assessment model for environmental systems v. 3.0. Environmental Research Laboratory, United States Environmental Protection Agency, Washington DC, **1991**
- [62] Fodor, F.; Gáspár, L.; Morales F.; Gogorcena, Y.; Lucena, J. J.; Cseh, E.; Kröpfel, K.; Abadía, J.; Sárvári, É. *Tree Phys.* **2005**, *25*, 1173–1180.
- [63] Nikolic, M.; Römheld, V. *Plant Physiol.* **2003**, *132*, 1303–1314.
- [64] Hell, R.; Stephan, U.W. *Planta* **2003**, *216*, 541–551.
- [65] Briat, J-F.; Cellier, F.; Gaymard, F. Ferritins and iron accumulation in plant tissues. In: Barton, L. L.; Abadía, J. (eds.) Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganism, pp. 341–357. Springer, Dordrecht, The Netherlands **2007**
- [66] Chasteen, N. D.; Harrison, P. M. *J. Struct. Biol.* **1999**, *126*, 182–194.
- [67] Tiffin, L. O. *Plant Physiol.* **1966**, *45*, 280–283.
- [68] Lopez-Millan, A-F.; Morales, F.; Abadía, A.; Abadía, J. *Plant Physiol.* **2000**, *124*, 873–884.
- [69] Stephan, U. W.; Schmidke, I.; Stephan, V. W.; Scholz, G. *Biometals* **1996**, *9*, 84–90.
- [70] Von Wirén, N.; Klair, S.; Bansal, S.; Briat, J. F.; Khodr, H.; Shiori, T.; Leigh R. A.; Hider, R. C. *Plant Physiol.* **1999**, *119*, 1107–1114.
- [71] Liu, D. H.; Adler, K.; SDtephan, U. W. *Protoplasma* **1998**, *201*, 213–220.
- [72] Pich, A.; Manteuffel, R.; Hillmer, S.; Scholz, G.; Schmidt, W. *J. Exp. Bot.* **2001**, *48*, 759–767.

- [73] Fodor, F. Heavy metals competing with iron under conditions involving phytoremediation. In: Barton, L. L.; Abadía, J. (eds.) Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganism, pp. 341–357. Springer, Dordrecht, The Netherlands **2007**
- [74] Smith, R. M.; Martell, A. E. Critical Stability Constants, Vols. 1–6, Plenum Press, New York, **1989**
- [75] Anderegg, G.; Ripperger, H. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 10, 647–650.
- [76] Varga, A.; Záray, Gy.; Fodor, F. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, 89, 149–154.
- [77] Chang, Y-C.; Zouari, M.; Gogorcena, Y.; Lucena, J. J.; Abadía, J. *Plant Physiol. Biochem.* **2003**, 41, 999–1005.
- [78] Lucena, C.; Montilla, I.; Romera, F. J.; Alcantara, E. *J. Plant Nutr.* **2003**, 26, 2069–2079.
- [79] Rauser, W. E. *Plant Physiol.* **1995**, 109, 1141–1149.
- [80] Hider, R. C. *Struct. Bond.* **1984**, 58, 25–87.
- [81] Senden, M. H. M. N.; Verburg, A. J. G. M.; van der Meer, T. G.; Wolterbeek, H. Th. *Plant and Soil* **1995**, 171, 333–339.
- [82] Tatár, E.; Mihucz, V. G.; Varga, A.; Záray, Gy.; Fodor, F. *Microchem. J.* **1998**, 58, 306–314.
- [83] Romera, F. J.; Lucena, C.; Alcántara E. Plant hormones influencing iron uptake in plants. In: Barton, L. L.; Abadía, J. (eds.) Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganism, pp. 341–357. Springer, Dordrecht, The Netherlands **2007**
- [84] Schikora, A.; Schmidt, W. *Plant and Soil* **2002**, 241, 87–96.
- [85] Dobbelaere, S.; Croonenborghs, A.; Thys, A.; Broek, A. V., Vanderleyden, J. *Plant and Soil* **1999**, 212, 155–164.
- [86] Goodman, B. A.; DeKock, P. C. *J. Plant Nutr.* **1982**, 5, 345–353.
- [87] Goodman, B. A.; DeKock, P. C.; Rush, J. D. *J. Plant Nutr.* **1982**, 5, 355–362.
- [88] Kilcoyne, S. H.; Bentley, P. M.; Thongbai, P.; Gordon, D. C.; Goodman, B. A. *Nucl. Inst. and Meth. in Physics Research B* **2000**, 160, 157–166.
- [89] Rodríguez, N.; Menéndez, N.; Tornero, J.; Amils, R.; de la Fuente, V. *New Phyt.* **2005**, 165, 781–789.

- [90] Murad, E. *Phys. Chem. Miner.* **1996**, *23*, 248–262.
- [91] Johnson, C. E. Mössbauer spectroscopy in Biology. In: Gonser, U. (ed.) Mössbauer spectroscopy pp. 139–165. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York **1975**
- [92] Long, G. J. Mössbauer Spectroscopy Applied to Inorganic Chemistry I., Plenum Press, New York, London **1984**
- [93] Petrouleas, V.; Brand, J. J.; Parrett, K. G.; Goldbeck, J. H. *Biochemistry* **1989**, *28*, 8980–8993.
- [94] Hudder, B. N.; Morales, J. G.; Stubna, A.; Münck, E.; Hendrich, M. P.; Lindhal, P. A. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 1029–1053.
- [95] Zouari, M.; Abadía, A.; Abadía, J. *J. Plant Nutr.* **2001**, *24*, 383–396.
- [96] Gogorcena, Y.; Abadía, J.; Abadía, A. *J. Plant Nutr.* **2000**, *23*, 9–21.
- [97] Buchanan, D. N. E. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1970**, *32*, 3531–3533.
- [98] Stevens, J. G.; Khasanov, A. M.; Miller, J. W.; Pollak, H.; Li, Z. (eds.) Mössbauer Mineral Handbook, pp. 326–328. Mössbauer Effect Data Center, Asheville, North Carolina **1998**
- [99] St. Pierre, G. T.; Bell, S. H.; Dickson, D. P. E.; Mann, S.; Webb, J.; Moore, G. R.; Williams, R. J. P. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *870*, 127–134.
- [100] Grohol, D.; Nocera, D. G.; Papoutsakis, D. *Phys. Rev. B* **2003**, *67*, 064401.
- [101] Blgham, S. M.; Schwertmann, U.; Carlson, L.; Murad, E. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1990**, *54*, 2743–2758.

Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

1. Kovács, K.; Kamnev, A. A.; Shchelochkov, A. G.; Kuzmann, E.; Medzihradszky-Schweiger, H.; Vértés, A. Mössbauer spectroscopic evidence for iron(III) complexation and reduction in acidic aqueous solutions of indole-3-butyric acid, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **2004**, *262*, 151–156.
2. Kovács, K.; Kamnev, A. A.; Kuzmann, E.; Homonnay, Z.; Szilágyi, P. Á.; Sharma, V. K.; Vértés, A. Mössbauer studies of iron(III)-(indole-3-alkanoic acids) systems in frozen aqueous solutions, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **2005**, *266*, 513–517.
3. Kovács, K.; Kuzmann, E.; Fodor, F.; Vértés, A.; Kamnev, A. A. Mössbauer study of iron uptake in cucumber root, *Hyperfine Int.*, **2005**, *165*, 289–294.
4. Kovács, K.; Kamnev, A. A.; Mink, J.; Németh, Cs.; Kuzmann, E.; Megyes, T.; Grósz, T.; Medzihradszky-Schweiger, H.; Vértés, A. Mössbauer, vibrational spectroscopic and solution X-ray diffraction studies of the structure of iron(III) complexes formed with indole-3-alkanoic acids in acidic aqueous solutions, *Struc. Chem.*, **2006**, *17*, 105–120.
5. Kovács, K.; Sharma, V. K.; Kamnev, A. A.; Kuzmann, E.; Homonnay, Z.; Vértés, A. Water and time dependent interaction of iron(III) with indole-3-acetic acid, *Struc. Chem.*, **2008**, *19*, 109–114.
6. Kovács, K.; Kuzmann, E.; Fodor, F.; Cseh, E.; Homonnay, Z.; Vértés, A. Mössbauer investigation of iron uptake in wheat, *Hyperfine Int.*, **2008**, *185*, 63–67.
7. Kovács, K.; Kuzmann, E.; Homonnay, Z.; Vértés, A.; Gunneriusson, L.; Sandström, A. Mössbauer study of synthetic jarosites, *Hyperfine Int.*, **2008**, *186*, 69–73.
8. Kovács, K.; Kuzmann, E.; Tatár, E.; Vértés, A.; Fodor, F. Investigation of iron pools in cucumber roots by Mössbauer spectroscopy: direct evidence for the Strategy I iron uptake mechanism, *Planta*, **2009**, *229*, 271–278.
9. Gunneriusson, L.; Sandström, A.; Holmgren, A.; Kuzmann, E.; Kovács, K.; Vértés, A. Jarosite inclusion of fluoride and its potential significance to bioleaching of sulphide minerals, *Hydrometallurgy*, **2009**, *96*, 108–116.

Summary

This work has been devoted to the application of transmission ^{57}Fe Mössbauer spectroscopy in plant physiology. In the first part, the chemical reactions of the phytohormone indole-3-acetic acid (IAA) and Fe^{III} were studied using mainly frozen solution Mössbauer technique. Mössbauer spectra of the acidic aqueous solutions of Fe^{III} with IAA showed two reactions between Fe^{III} and the ligand. One pathway resulted in a complex formation which precipitated from the solution, whereas the other root is a redox process yielding Fe^{II} and oxidised products of indole-3-acetic acid. The chemical composition and coordination structure of the precipitated Fe-IAA complex were studied using Mössbauer spectroscopy, vibrational spectroscopic and solution X-ray diffraction techniques. The data obtained supported the μ -dihydroxo structure of the dimer: $[(\text{IA})_2\text{Fe}(\mu\text{-OH})_2\text{Fe}(\text{IA})_2]$ (where IA is indole-3-acetate).

In the second part, the distinct chemical species of iron were investigated by Mössbauer spectroscopy during iron uptake into cucumber and wheat grown with and without $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrate. The Mössbauer parameters in the case of iron-sufficient roots revealed high-spin Fe^{III} components suggesting the presence of Fe^{III} -carboxylate complexes, hydrous ferric oxides and sulfate-hydroxide containing species. Iron deficient cucumber roots supplied with iron contained significant amount of Fe^{II} in hexaaqua coordination environment. This is a direct evidence for the Strategy I iron uptake mechanism. Correlation was found between the decrease in iron reductase activity and the ratio of Fe^{II} - Fe^{III} components as the time of iron supply was increased. Our data may refer to a higher reduction rate as compared to its uptake or reoxidation in the cytoplasm in accordance with the increased reduction rate in iron deficient Strategy I plants.

No Fe^{II} could be found in wheat under similar conditions which confirms the mechanism proposed for iron uptake into plants belonging to Strategy II. In cucumber, the effect of Cd on the accumulation and uptake of iron was also studied. The data obtained show the inhibitory effect of Cd^{2+} on the iron reduction and the competition between Cd^{2+} and Fe^{2+} during the membrane transport. No difference could be found in the Fe^{III} -components present in iron sufficient cucumber roots grown without and with Cd.

Összefoglalás

Munkám során két, növényélettani vonatkozású témában felmerült kérdésekre kerestem a választ, transzmissziós ^{57}Fe Mössbauer-spektroszkópia segítségével. Az első részben az egyik legfontosabb növényi hormon, az indol-3-ecetsav (IAA) Fe^{III} -mal történő kémiai reakcióit vizsgáltam, elsősorban lefagyasztott oldatminták segítségével. A savas vizes oldatokra kapott eredmények alapján a Fe^{III} és IAA között kétféle reakció játszódik le. Az egyik reakció egy komplexképződés, mely egyben csapadékképződéssel jár. A másik reakció egy redoxifolyamat, ami [hexaakva-vas(II)] és az IAA oxidált termékeinek képződését eredményezi. A vizes közegben csapadékként megjelenő Fe-IAA komplex szerkezetét Mössbauer spektroszkópiával, infravörös és Raman-spektroszkópiával és folyadék-röntgendiffrakciós technikával vizsgáltam. Az eredmények alapján a komplex μ -dihidroxo híddal kapcsolódó dimer, melynek képlete: $[(\text{IA})_2\text{Fe}(\mu\text{-OH})_2\text{Fe}(\text{IA})_2]$ (ahol IA indol-3-acetát).

A második részben a növény gyökerében előforduló vasvegyületeket és a vASFelvételi mechanizmusokat vizsgáltam elsősorban Mössbauer-spektroszkópiával, $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citráton és anélkül nevelt uborka és búza növények felhasználásával. Az elegendő vassal ellátott növények gyökerében a vas három fő kémiai környezetben található meg: Fe^{III} -karboxilátok, ferrihidrit és Fe^{III} -szulfát-hidroxidok. A vashiányos, majd vassal ellátott uborka gyökerében jelentős mennyiségű Fe^{II} -komponens képződését mutattam ki, amivel közvetlen bizonyítékot adtam az I. vASFelvételi stratégia mechanizmusára. Összefüggést állapítottam meg a vas-kelát reduktáz aktivitás csökkenése, a Fe^{II} - Fe^{III} -komponensek aránya és az alkalmazott vasellátás ideje között. Az eredmények alapján a redukciós folyamatok a felvételhez illetve a reoxidációs folyamatokhoz képest gyorsabban játszódnak le, ami összhangban áll az I. vASFelvételi stratégiát követő növények vashiányos állapotban növekvő redukciós kapacitásával.

Búza esetében hasonló körülmények mellett Fe^{II} -komponenst nem mutattam ki, amivel megerősítettem a II. vASFelvételi stratégiára vonatkozó mechanizmust. Ezen felül uborka esetén a Cd^{2+} vASFelvételre és az egyes vasvegyületekre kifejtett hatását is vizsgáltam. Eredményeim alapján a Cd^{2+} gátolja a vas-kelát reduktáz enzim működését és a Fe^{2+} -ionok membránon keresztül történő transzportját. Az elegendő vassal ellátott uborka gyökerében a kadmium nem befolyásolja a gyökérben megtalálható Fe^{III} -vegyületek előfordulását.